AUS DER CHIRURGISCHEN KLINIK A DER
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Direktor:
Prof. Dr. med. K. Kremer

AUTOTRANSPLANTATION VON LANGERHANS'SCHEN INSELN IN DIE LEBER DIABETISCHER HUNDE.

PROBLEME DER INSELISOLIERUNG, DES VERSUCHSMODELLES, DER INTRAPORTALEN TRANSPLANTATION UND DER FUNKTIONSKONTROLLE

DISSERTATION
ZUR
ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS DER MEDIZIN
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

vorgelegt
von

JÜRGEN BRAND

Dezember 1982

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

Der Dekan
der Medizinischen Fakultät
der Universität Düsseldorf

gez. Prof. Dr. Brüster

Referent
gez. Prof. Dr. Meyer

Korreferent
gez. Prof. Dr. Borchard

Meiner lieben Familie gewidmet

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41536505_0062

Die vorliegende Arbeit wurde auf Anregung und unter Leitung von Herrn Prof. Dr. W. M e y e r an der Chirurgischen Klinik A der Universität Düsseldorf erstellt.

Meinem Doktorvater,

Herrn Prof. Dr. W. M e y e r,

danke ich herzlich für die stets hilfreiche Betreuung, Unterstützung undFörderung meiner Arbeit sowie für die mir jederzeit entgegengebrachte Großzügigkeit.

Meinem Korreferenten,

Herrn Prof. Dr. B o r c h a r d,

danke ich für die Erstellung des Korreferates und besonders für die großzügige Übernahme bei der histologischen Verlaufskontrolle der Versuche, ohne die eine sinnvolle Auswertung nicht möglich gewesen wäre.

Meinem Betreuer des praktischen Arbeitsteiles,

Herrn Priv. Doz. W. v o n d e r H o r s t,

bin ich in Freundschaft und Dankbarkeit verbunden für seine geduldige und freundliche Anleitung zu vorliegenden Versuchen. Von seiner großen operativen Erfahrung habe ich, auch für die Zukunft, sehr profitiert.

Weiterhin bin ich Frau Brauns für ihre Hilfe bei der Einrichtung unseres Labors sehr dankbar.

Schließlich danke ich meinen Brüdern Heiner und Siegfried für die Reinschrift und den Druck der vorliegenden Arbeit.

AUS DER CHIRURGISCHEN KLINIK A DER
UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

Direktor :
Prof. Dr. med. K. Kremer

AUTOTRANSPLANTATION VON LANGERHANS ˜SCHEN INSELN IN DIE LEBER DIABETISCHER HUNDE . –

PROBLEME DER INSELISOLIERUNG, DES VERSUCHSMODELLES, DER INTRAPORTALEN TRANSPLANTATION UND DER FUNKTIONSKONTROLLE

DISSERTATION

ZUR

ERLANGUNG DES GRADES EINES DOKTORS DER MEDIZIN
DER MEDIZINISCHEN FAKULTÄT DER UNIVERSITÄT DÜSSELDORF

vorgelegt
von

JÜRGEN BRAND

Dezember 1982

Inhaltsangabe Seite

I. Einleitung 1

II. Einführung in die Fragestellung 5

1. Entwicklung und heutiger Stand der Pankreasinselisolierung 5

2. Entwicklung und heutiger Stand der Transplantation von Langerhans"schen Inseln 10

3. Zielsetzung dieser Arbeit 14

III. Material und experimentelle Methodik 15

1. Versuchsmodell des diabetischen Hundes 15

a. Narkose 15

b. Duodenopankreatektomie 16

c. Pankreatektomie nach Markowitz 20

d. Postoperative Versorgung 21

2. Inselisolierung und Transplantation 22

a. Aufbereitung des Organes 22

b. Isolierung durch Stufenfiltration 24

c. Transplantation 28

d. Versuchsabschluß 29

3. Labormethoden 30

4. Statistik 32

IV. Ergebnisse 34

1. Isolationsausbeute und Histologie 34

2. Normale Kontrolltiere 38

a. Blutzuckerverhalten 38

b. Glucosetoleranzteste 38

c. Seruminsulinbestimmung 38

3. Diabetische Kontrolltiere 42

a. Postoperativer Verlauf 42

b. Blutzuckerverhalten 43

c. Glucosetoleranztest 43

d. Seruminsulinspiegel 43

Seite

4. Autotransplantation 47
   a. Postoperativer Verlauf 47
   b. Blutzuckerverhalten 48
   c. Glucosetoleranzteste 48
   d. Seruminsulinspiegel 48
   e. Leberfunktionsdiagnostik 53
   f. Histologie 56

5. Statistische Auswertung 61
   a. Blutzuckerverhalten 61
   b. Glucosetoleranzteste 64
   c. Seruminsulin 64

V. Diskussion 68
   1. Inselisolierung 69
   2. Diabetesmodell 72
   3. Reaktion des Gastorganes 74
   4. Funktion der Insel nach Autotransplantation 76

VI. Zusammenfassung 79

VII. Literaturverzeichnis 81

I. Einleitung

Vor über 100 Jahren beschrieb Paul Langerhans in einem Beitrag zur Mikroanatomie der Bauchspeicheldrüse spezielle, inselförmige Zellverbände, welche später nach ihrem Entdecker den Namen "Langerhans'sche Inseln" erhielten.

Diese Entdeckung regte in der Folgezeit zu etlichen Studien über den endokrinen Anteil des Pankreas an. Einige von ihnen kamen der Erkennung des Zusammenhanges zwischen dem Diabetes mellitus und den Langerhans'schen Inseln bald nahe.

Moses Baron schrieb bereits 1920, daß die Inseln ein Hormon direkt in die Lymph- oder Blutbahnen sezernieren, welches in der Lage sei, den Kohlehydratstoffwechsel zu kontrollieren. 1922 endlich veröffentlichten Banting, Best und Collip ihre epochemachende Schrift mit dem Titel: "Pancreatic Extracts in the Treatment of Diabetes Mellitus". Diese Veröffentlichung bildete die Grundlage zur Behandlung des insulinpflichtigen Diabetes.

Heute, fast 60 Jahre später, haben sich durch die Insulinsubstitution die Probleme in der Diabetesbehandlung verschoben. Besonders deutlich wird dies bei der vom Diabetes besonders hart betroffenen Patientengruppe, den juvenilen Diabetikern. Während diese vor Einführung der Insulinbehandlung sehr früh unter den Zeichen einer massiven Glucosurie im diabetischen bzw. ketoazidotischen Koma verstarben, erreichen sie heute leicht das Erwachsenenalter.

Doch trotz möglichst exakter Blutzuckereinstellung durch exogene Insulinzufuhr zeigten sich bald neue Probleme.

Bezeichnenderweise sterben in unseren Tagen ca. fünfmal mehr Menschen an den Spätfolgen des Diabetes als um die Jahrhundertwende. Dieses ist wahrscheinlich zurückzuführen auf die relative Abnahme anderer schwerer Leiden durch Fortschritte in der Behandlung derselben, andererseits aber auch durch die weitere Verbreitung des

Diabetes mellitus, die zum Teil erst dadurch möglich wurde, daß dank Insulintherapie die juvenilen Diabetiker leicht das Fertilitätsalter erreichen (26). Während das diabetische Koma in unseren Mortalitätsstatistiken einen immer geringeren Stellenwert einnimmt, sind es nun die sekundären, die Gefäßkomplikationen, welche die Statistiken füllen.

In den USA ist der Diabetes führende Ursache für die Blindheit. Ebenso für ca. 50 % aller Koronarokklusionen und 80 % aller wegen Gangrän amputierter Gliedmaßen. Eine weitere, häufig zum Tode führende Komplikation stellt auch die gefürchtete diabetische Nephropathie dar (25).

Trotz Insulinbehandlung machen diese Spätschäden eine Suche nach neuen, verbesserten Therapiemöglichkeiten erforderlich. Es erscheint erwiesen, daß nur die physiologische, d.h. vom Inselapparat des Pankreas "selbst vorgenommene" Blutzuckereinstellung zur Vermeidung vaskulärer Schäden führt.

Wie Mauer (56) zeigt, bilden sich im Experiment die Kimmelstiel-Wilson-Glomerubonephropathien von Nieren diabetischer Spendertiere nach Transplantation in nicht diabetische Empfänger sogar zurück. Umgekehrt ist der Verlauf nach Transplantation von Nieren gesunder Tiere auf Tiere mit experimentell erzeugtem Diabetes.

Diese Tatsachen weisen konsequent den Weg in eine bestimmte Richtung zur Verbesserung der Diabetestherapie, in Richtung auf den Ersatz des geschädigten inkretorischen Pankreasanteils, die Implantation eines funktionstüchtigen, natürlichen oder künstlichen Inselapparates.

Bis vor wenigen Jahren galt das Hauptinteresse der kompletten Pankreastransplantation mit Duodenalsegment oder der Transplantation des distalen Pankreasanteils.

Nach Erfolgen in tierexperimentellen Vorversuchen wurden bis 1976 51 Pankreastransplantationen durchgeführt (32; 45). Trotz nachgewiesener endokriner Funktion waren die Ergebnisse insgesamt enttäuschend. Anostomoseninsuffizienzen, Gangrän des mittransplantierten Duodenalsegmentes mit Perforation, Fistelbildungen, Blutungen, Abszeßbildungen und Abstoßungsreaktionen kennzeichneten etliche Verläufe (46).

Wegen dieser Komplikationen gewann der Versuch der Transplantation von isolierten Langerhans'schen Inseln, nach ersten Experimenten Ende der 60er Jahre, in jüngster Zeit zunehmend an Bedeutung. Tierexperimentelle Befunde zeigten nach gelungener Inseltransplantation mit erreichter Normoglykämie die Möglichkeit zur Vermeidung bzw. Rückbildung diabetischer Spätschäden (19; 56; 80).

Ein weiteres Feld für die Inseltransplantation erschließt sich durch ihre Anwendung nach erforderlicher Duodenopankreatektomie oder subtotaler Pankreatektomie wegen chronisch rezidivierender Pankreatitiden bei entsprechender Indikationsstellung. Auch diesem Patientenkreis könnte nach Isolierung des endokrinen Pankreasteiles und dessen gelungener Transplantation der ansonsten unvermeidbare, schwierig einzustellende Diabetes erspart bleiben, oder der Insulinbedarf zumindest verringert werden. Auch hierüber liegen schon einige klinische Erfahrungen z.B. von Dobroschke, Sutherland und Najarian vor (16; 82). Doch zeigte sich, trotz einiger tierexperimenteller Erfolge, die in der Praxis angewandte Inseltransplantation als zu wenig wirksam (45).

Das Hauptproblem liegt bis heute in der Isolierung einer ausreichenden Zahl von intakten, funktionstüchtigen Inseln (25; 50; 76). Weitere Probleme ergeben sich in der Wahl eines geeigneten Implantationsortes. Dazu liegen Studien mit verschiedenen Gastgeweben wie Leber, Milz, Lunge, Muskel, Nierenkapsel, Peritonealhöhle und Subkutangewebe vor.

Schließlich bleibt noch die hohe immunologische Empfindlichkeit der Zellen (84) zu nennen - nur bei autologer Transplantation wie z.B. nach notwendiger Duodenopankreatektomie bei chronischer Pankreatitis entfällt dieses Problem -, die z.T. durch die große Oberfläche bedingt scheint, welche diese einzelnen kleinen Partikel im Vergleich zu kompletten Organtransplantaten der Immunreaktion des Empfängers bieten (7).

Brown (13) zeigt, daß möglicherweise die immunologische Empfindlichkeit durch exakte Isolierung von umgebendem exokrinen Gewebe noch erhöht wird.

II. Einführung in die Fragestellung

1. Entwicklung und heutiger Stand der Pankreasinselisolierung

Das erste Verfahren zur Isolierung von Langerhans'schen Inseln wurde 1914 von Bensley beschrieben. Es handelte sich hierbei um das Auslösen einzelner, gefärbter Inseln aus dem Gewebeverband. Dieses mühsame Verfahren wird bis heute in abgewandelter Form als sogenanntes "Hand-Picking" verwendet.

Eine für die folgenden Isolationsversuche grundlegende Arbeit stellte 1965 Moskalewski (64) vor. Er beschrieb die Isolierung von Langerhans'schen Inseln zur Konservierung zwecks histologischer und morphologischer Studien. Hierzu benutzte er - wie auch die meisten folgenden Untersucher - Pankreata von Nagetieren. Die Organe wurden mit Scheren in möglichst kleine Partikel zerteilt und anschließend in "Hanks'scher" Lösung gewaschen. Hierauf folgte eine enzymatische Gewebedigestion mittels Kollagenase, ein aus Clostridium histolyticum gewonnener Enzymkomplex. Von dieser Digestion bleibt das endokrine Gewebe anfangs unbetroffen, während die bindegewebigen Brücken des Organs weitgehend aufgelöst werden.

Moskalewski verwandte eine Lösung von 35 mg Kollagenase auf 8 ml "Hank's"-Lösung. Die Inkubationszeit betrug bei 37°C 30 - 45 Minuten. Hier schwanken auch bei weiteren Autoren die Angaben stark. Nicht zuletzt wohl deshalb, weil die Enzymanteile verschiedener Chargen, auch bei gleichem Hersteller, stark differieren können (76).

Nach mehrmaligem Waschen des so gewonnenen Materials folgte das "Hand-Picking" unter dem Dissektionsmikroskop.

Dieses Verfahren eignet sich sicherlich für funktionelle und anatomische Studien am Nagetierpankreas, doch ist die Identifikation ohne selektive Anfärbung der Inseln beim Säugetier wie auch beim Menschen kaum möglich und das Verfahren zu zeitaufwendig, wenn es

darum geht, einen zu Transplantationszwecken genügenden Ertrag zu erzielen (25; 50; 76). Das gilt vor allem deshalb, weil für den Transplantationserfolg beim Menschen 50.000 - 175.000 intakte Inseln für erforderlich gehalten werden (25). Auch Sutherland kommt zu ähnlichen Ergebnissen, indem er bei intraportaler Applikation (s.u.) 6 % der normalerweise vorhandenen Inseln für notwendig hält (82).

Lacy und Kostianowski modifizierten die Methode, indem sie durch Injektion einer Salzlösung in den Ductus Pankreaticus eine mechanische Zerreißung der Lobuli erreichten, um so nach weiterer Zerkleinerung den Enzymkontakt zu verbessern (42). Doch auch hier folgte zunächst die Isolierung unter dem Dissektionsmikroskop.

Diese mechanische Distension wurde in Folge fester Bestandteil fast aller Verfahren. Scharp (76) versuchte auch die Injektion auf venösem und arteriellem Wege, wobei er eine ihm vorteilhaft erscheinende intralobuläre Zerreißung erzielte, die jedoch bei der endgültigen Präparation keinen Unterschied zu der schließlich auch weiter von ihm praktizierten intraductalen Distension mit interlobulärer Sprengung erkennen ließ.

In dieser Arbeit von Lacy (42) wird auch eine Zentrifugationsmethode beschrieben, die, in abgewandelter Form, bis zum heutigen Tage in der Inselisolierung Verwendung findet. Mit dem Ziel, auf schnellerem Wege zu einer besseren Ausbeute zu gelangen, zentrifugierte er das durch oben beschriebene Digestion gewonnene Material, nachdem er es auf die oberste von 4 Schichten Saccharoselösung mit abgestuften Konzentrationen aufbrachte. Eine befriedigende Ausbeute befand sich nach der Zentrifugation an der Oberfläche der mittleren Schichten.

Bei der in vitro-Prüfung der so gewonnenen Inseln konnte jedoch keine Insulinsekretion mehr nachgewiesen werden.

Auch bei Verwendung von Fikoll, einem hochmolekularen Polymer der Saccharose, zeigte sich die Funktionsstörung infolge der hohen Osmolarität der Lösungen (47). Diese Funktionsstörung wird erst nach vorheriger Dialyse der Fikoll-Lösung mit Befreiung von Natrium und Kalium und niedermolekularem Polymer der Saccharose aufgehoben (5; 32; 73).

Zwar beschreiben Ashcroft et al., Ballinger und Lacy und Sutherland et al. (4; 5; 80) eine Insulinausschüttung in vitro von menschlichen Inseln, welche durch die "Fikoll-Methode" isoliert wurden, doch wird von niemandem ein befriedigender Ertrag an intakten Inseln erzielt.

Eine weitere Variante der Digestions-Zentrifugations-Methode brachten Scharp et al. (74) und Shibata (77) ein.

Wie oben bereits angedeutet, bereitet die Bestimmung der Digestionszeit prinzipiell Schwierigkeiten. Unter anderem wegen der fehlenden Kontrolle über die Bestandteile und die Aktivität des Enzymkomplexes Kollagenase, fällt die Entscheidung schwer, ob nach einer bestimmten Digestionszeit mehr isolierte Inseln geschädigt werden oder aber zahlreiche Inseln in größeren Gewebeverbänden verborgen bleiben. Daher verwendeten Scharp und Shibata Filter mit 260 µ Porendurchmesser, die eine Passage isolierter Inseln wie auch natürlich exokrinen Materials gleicher Größe erlaubten. Die Abfiltration erfolgte bereits während der Digestion und schützte so bereits isolierte Inseln vor einer enzymatischen Schädigung, so daß der Verdauungsprozeß beliebig lange fortgesetzt werden konnte. Zur Minderung der Verunreinigung mit exokrinem Material erfolgte hiernach die "Fikoll-Schichtentrennung". Jedoch fand Scharp auch bei Verwendung dieser Methode zur Aufarbeitung menschlicher Pankreata keine befriedigende Ausbeute.

Ein weiterer Versuch Scharps (76) an Nagetierpankreas verließ das Konzept der Isolierung kompletter Inseln. Das Pankreasgewebe

wurde bis zur Erstehung einer Einzelzellpräparation der Digestion unterzogen und diese teilweise mittels der "Fikoll-Gradienten" gereinigt. Die weitere Anreicherung von endokrinen Zellen resultierte aus einer selektiven Aggregation zu Pseudoinseln in der Zellkultur.

Mirkovitch beschritt einen anderen Weg, indem er stark zerkleinertes Pankreasgewebe zwar mit Kollagenase 20 min andaute und so den größten Teil der exokrinen Aktivität zerstörte, auf eine weitere Trennung jedoch völlig verzichtete. Den entstandenen Gewebebrei transplantierte er Hunden via Pfortader in die Leber und verursachte hierdurch Portalastobstruktionen großen Ausmaßes (58). Pfortaderhochdruck war die Folge.

Kretschmer verzichtete ebenfalls auf eine Trennung, wählte aber als Gastorgan die Milz und erzielte hiermit im Hundeversuch gute Erfolge (39).

Nachdem Najarian und Matas (53) bei Anwendung dieser Methode über klinische Erfahrungen verfügen, scheint die Isolierung zwar weiter wünschenswert - vor allem zur Schonung des Transplantationsortes - doch keine Notwendigkeit mehr darzustellen, wenn die Gewebepartikel klein genug und weitgehend frei von Enzymen sind (76; 53; 58).

Als weitere Vorbereitung zur Transplantation dienten zahlreiche Versuche der Kultivierung und Konservierung von Pankreasinseln. Hierdurch ergibt sich die Möglichkeit zur Ansammlung einer ausreichenden Menge. Außerdem bleibt hinreichend Zeit zur Gewebetypisierung bei Allotransplantationen (3; 49).

Bei Verwendung von fetalem Gewebe kann durch Kultivierung eine Funktionsaufnahme der Inseln und möglicherweise eine Zellvermehrung erreicht werden (50).

Auch die Änderung der Antigenität durch Kultivierung wird diskutiert (44).

Durch Kurzkultivierung über 24h mit Pilokarpin, Kobald und Aprotonin nimmt der Insulin-Analyse-Quotient rasch zu (53). Die Inselkultivierung in "Eagles-Medium" mit 20 % Kälberserum und Penicillin bei 37°C und 95 % O_2 ergibt bis zum 7. Tag normale Sekretion wie bei frisch isolierten Zellen und Funktionsaufnahme 1 Woche nach Transplantation über die V. portae in die Leber (68).

Nach Kryopräservation von isolierten Inseln der Ratte zeigt sich eine normale in vitro und in vivo-Funktion (14; 35).

2. Entwicklung und heutiger Stand der Transplantation von Langerhans'schen Inseln

Entsprechend den Erfahrungen auf dem Gebiet der Inselisolierung beruhen bis heute die meisten Erkenntnisse bei der Transplantation auf Versuchen an Nagetieren.

Die Idee lieferte Browning (15) 1951. Er verpflanzte Mäusen mit experimentellem Diabetes embryonale Pankreasgewebestücke in Wangen, Hoden, Subkutangewebe und in die vordere Augenkammer. Das Angehen der Transplantate war histologisch gesichert, ein Effekt auf das Blutzuckerverhalten jedoch nur bei zwei Tieren nachweisbar. Brooks (11) mußte sogar von einer Schädigung des Wirtsgewebes durch exokrine Enzyme nach Verpflanzung adulten Pankreasgewebes berichten.

Die Ära der Inseltransplantation begann erst nach Moskalewskis gelungener Inselisolierung. Als erster transplantierte 1970 Younozai isolierte Inseln auf Ratten, wobei der experimentelle Diabetes nur vorübergehend beeinflußt wurde (87). 1972 berichteten Ballinger und Lacy (5) über die Inseltransplantation ebenfalls in die Periotonealhöhle von Ratten mit experimentell erzeugtem Diabetes. Hierbei konnte die Stoffwechsellage erstmalig lang anhaltend gebessert werden.

Seit dieser Zeit haben zahlreiche Arbeitsgruppen die Anregung aufgenommen und viele Verbesserungen in der Transplantationstechnik erreicht. Als Implantationsort diente dabei zunächst weiter die Peritonealhöhle (5; 34; 54; 57), daneben auch das Subkutangewebe mit mäßigen Ergebnissen (34; 37), weiter die Einbettung unter die Nierenkapsel (12; 60), wobei eine deutliche Funktionsverbesserung nach Anlage eines porto-renalen Shunts erreicht werden konnte (9; 65). Auch werden intravenöse und intramuskuläre (6) Applikationen beschrieben.

Einen günstigen Implantationsort fand erstmals Kemp (34) durch die Transplantation via Pfortader in die Leber, die sich als weitaus wirkungsvoller als die intraperitoneale erwies.

Zahlreiche Untersucher konnten später diese Ergebnisse bestätigen (1; 18; 24; 34; 55; 57) oder sogar nachweisen, daß nicht nur der Glucosestoffwechsel normalisiert wurde, sondern auch mikroangiopathische Veränderungen an Augen und Niere reversibel waren (19; 56).

Lorenz und Lippert beschritten erfolgreich denselben Weg (48), wobei ihnen ebenso wie Amamoo (1) auch der wichtige Nachweis gelang, daß die Leberfunktion nicht beeinträchtigt wurde. Bretzel beschreibt ein morphologisch nachweisbares, reaktionsloses Einheilen der Inseln im intrahepatischen Portalnetz (10). Unter diesen Voraussetzungen scheint die heterotope Lokalisation des Meßfühlers und Reglers "Insel" im Portalnetz besonders günstig zu sein, da sie ja den physiologischen Verhältnissen mit Anschluß an den Portalkreislauf sehr nahe kommt.

Gute Erfahrungen aus jünster Zeit liegen auch bei Verwendung der Milz als Implantationsort vor (36; 40). Mirkovitch nahm 1976 als erster eine Autotransplantation in die Milz über retrograde Kanülierung der V. lienalis vor. Hierbei waren die Pankreasfragmente nur mit Kollagenase vorbehandelt, eine Gewebepurifikation fand nicht statt (58). Kretschmer zeigte, daß auch die direkte Inokulation von adultem Pankreasgewebe in die Milzpulpa beim Hund erfolgreich ist (41). Sutherland hält beim Hund die Transplantation in die Milz für geeigneter, da der Hund besonders empfindlich auf eine portale Hypertension reagiert (83). Dies ist sicherlich besonders bei Transplantationen ohne Trennung von exokrinem Gewebe der Fall (40), während ansonsten bedeutsame Anstiege des Pfortaderdruckes nicht gemessen werden.

Heute stellen die Milz und die Leber bevorzugte Zielorte der Inseltransplantation dar.

Im Tierexperiment bei Autotransplantation und bei Transplantationen zwischen isologen Rattenstämmen konnte die endokrinologische Wirksamkeit der transplantierten Inselzellen langfristig nachgewiesen werden. Als allogenes Transplantat verlieren die Zellen nach kurzer Funktionsdauer jedoch infolge Abstoßung ihre Wirkung (7; 29).

Diese Ergebnisse lassen sich auf verschiedene Tierarten wie Ratten (78), Mäuse (70), Hunde (81) und Affen (74) übertragen.

Die schnelle Abstoßungsreaktion ist sowohl auf zelluläre wie auch auf humorale Abwehrmechanismen zurückzuführen (7).

Bei Gewebeinkompatibilität ergeben sich sehr kurze Überlebenszeiten von 3 - 10 Tagen (7, 22).

Bei Gewebekompatibilität läuft die Abstoßung vergleichsweise verzögert ab. Ziegler (88) gibt eine mittlere Überlebenszeit von 30 Tagen an.

Die Bemühungen, eine Abstoßungsreaktion zu unterdrücken, lassen sich in 5 Gruppen unterteilen:

a) Verminderung der Histoinkompatibilität durch Gewebetypisierung.

b) Beeinflussung der Immunogenität durch Verwendung fetalen Gewebes oder durch Kultivierung mit spezieller Behandlung innerhalb der Kultur (43, 85).

c) Wahl immunologisch vorteilhafter Implantationsorte (7).

d) Immunsuppression; umfassende Untersuchungen über verschiedene Möglichkeiten der Immunsuppression liefern Morris (61), Mullen (66) und Slavin (79).

e) Anschluß eines Transplantatbehältnisses an das Gefäßsystem des Empfängers, durch welches aufgrund besonders gewählter Membranen einerseits eine ausreichende Ernährung der Transplantate erfolgte, andererseits jedoch der Kontakt mit Antikörpern bzw. immunologisch aktiven Zellen verhindert wird (86).

Die im Tierexperiment gut reproduzierbaren, erfolgreichen Inselzelltransplantationen ermutigten Najarian 1977 zu den ersten allogenen Inseltransplantationen beim Menschen (67). Er transplantierte 7 niereninsuffizienten Diabetikern simultan unter entsprechender Immunsuppression eine Niere und intraportal sowie intraperitoneal Inseln des gleichen Spenders.

Bei intraportaler Applikation ging der Insulinbedarf für die Dauer von 2 - 9 Wochen zurück, in einem Fall sogar 18 Monate. Der Pfortaderdruck stieg nicht an und Leberfunktionsstörungen traten nicht auf. Die unzureichende Funktion wurde unter anderem auch auf die ungenügende Inselausbeute unter Verwendung der "Fikoll - Gradiententechnik" zurückgeführt.

Largiadèr berichtet über einen erstaunlichen Erfolg im Rahmen mehrerer Allotransplantationen. Nach gleichzeitiger Nieren- und Inseltransplantation bestand über ein Jahr kein Insulinbedarf (45).

Mit autogenen Transplantaten von Pankreasfragmenten oder isolierten Inseln war es bisher mehrfach möglich, nach erforderlicher Duodenopankreatektomie wegen einer chronisch rezidivierenden Pankreatitis den pankreopriven Diabetes zu verhindern bzw. abzumildern, so daß sich zumindest dieses Verfahren als therapeutische Alternative zur exogenen Insulinsubstitution und damit zur Verhinderung von eventuellen Spätfolgen anbietet (16, 83).

3. Zielsetzung dieser Arbeit

Wir beabsichtigten, die Pankreasinselisolierung entsprechend den Erfahrungen anderer Arbeitsgruppen zu modifizieren, um so ein eigenes, standartisiertes, für größere Pankreasgewebemengen geeignetes Verfahren zu erarbeiten. Dieses Verfahren sollte folgende Voraussetzungen erfüllen:

Die Methode mußte möglichst einfach und gut reproduzierbar sein. Mit Blick auf eventuelle klinische Anwendung wurden besonders chirurgische Aspekte wie Sterilität und gute Praktikabilität berücksichtigt. Für die Ergiebigkeit der Isolierung wurden mindestens 10 % der Gesamtzahl von funktionstüchtigen Langerhans'schen Inseln angestrebt.

Eine weitere wichtige Aufgabe der Arbeit war die Erprobung des Verfahrens durch Autotransplantation des gewonnenen Materials via Portader in die Leber. Als Diabetesmodell wählten wir pankreatektomierte Hunde.

Zu diesem Zweck wurden zunächst die Stoffwechselvorgänge am pankreatektomierten, diabetischen Hund ohne Transplantation von Inseln untersucht, um dann einen direkten Vergleich mit den Tieren nach Inseltransplantation ziehen zu können. Die Funktionskontrolle des Transplantates sollte durch Bestimmung des Blutzuckerverhaltens, durch Glucosetoleranzteste und Seruminsulinbestimmung erfolgen.

Ein weiteres Ziel war, durch histologische Aufarbeitung der Lebern nach Versuchsabschluß das Schicksal der Inseln im Wirtsorgan zu erhellen.

Im Hinblick auf eine eventuelle klinische Anwendung der Methode mußte auch eine Schädigung der Leber durch das Transplantat sicher und langfristig ausgeschlossen werden. Hierzu wählten wir neben der abschließenden Histologie die Pfortaderdruckmessung, einzelne Portographien und Leberfunktionskontrollen durch Bestimmung der Leberenzyme.

III. Material und experimentelle Methodik

1. Versuchsmodell des diabetischen Hundes

a. Narkose

Präoperativ wurden sämtliche Hunde einer 15 - 20 stündigen Nährungskarenz unterzogen. Als Prämedikation erhielten alle Tiere 0,25 ml/kg Körpergewicht Combelen (Proprionylpromazin) und 0,5 mg Atropin intramuskulär. Nach Anlegen eines Venenkatheters erfolgte Anästhesie mittels 1 ml/kg KG Chloralose.

Zwecks Aspirationsprophylaxe und besserer Versorgungsmöglichkeit eventueller respiratorischer Insuffizienzen wurden sämtliche Tiere intubiert, wobei sie jedoch unter Spontanatmung belassen wurden. Die Volumensubstitution erfolgte durch Infusion von Ringerlösung, bestimmt durch den Operationsverlauf und das jeweilige Kreislaufverhalten des Tieres.

b. Duodenopankreatektomie

Mediane Oberbauchlaparatomie, Darstellung der Cauda pankreatica und Präparation derselben unter sorgfältiger Blutstillung und Schonung der A. u. V. lienalis.

Auslösung des Pankreas aus dem hinteren Blatt des Omentum. Skelettieren des duodenalen Pankreasschenkels und Durchtrennung des Duodenums am Übergang von der Pars II zur Pars III zwischen zwei Klemmen in typischer Weise.

Anschließend folgt die Skelettierung des Antrums Ventriculi an der großen und kleinen Kurvatur. Absetzen des Magens an der Corpus-Antrum Grenze, Darstellung der Gebilde des Ligamentum hepatoduodenale und Durchtrennung des Ductus choledochus zwischen zwei Overholtklemmen. Der Choledochusstumpf wird mit einer doppelten Dexonligatur versorgt.

Um die Ischämiezeit des Organs möglichst gering zu halten, findet die Durchtrennung der A. pankreaticoduodenalis sup. erst am Ende der Präparation statt.

Zur Rekonstruktion wird eine End-zu-End-Gastroduodenostomie im Sinne eines BI angelegt. Für die biliodigestive Anostomose wird die oberste Jejunumschlinge antecolisch Seit-zu-Seit mit der Gallenblase anostomosiert.

Weiterhin wird eine Brown'sche Fußpunktanostomose angelegt. Drainage, schichtweiser Wundverschluß, steriler Verband.

Die Abbildungen 1, 2 u. 2 a zeigen das Operationspräparat bzw. den Op.-Situs nach Rekonstruktion.

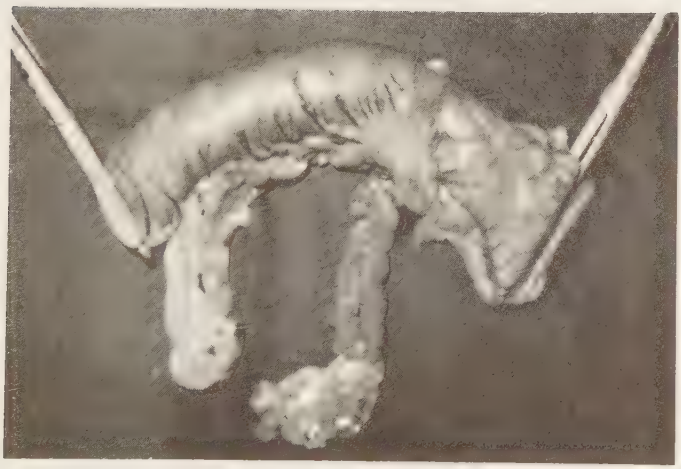


Abb. 1: Operationspräparat nach Duodenopankreatektomie
Rechts im Bild die Antrum- u. Pylorusregion.

Abb. 2 u. 2a: Foto bzw. Skizze des Op.-Situs nach Reanostomosierung bei Duodenopankreatektomie.

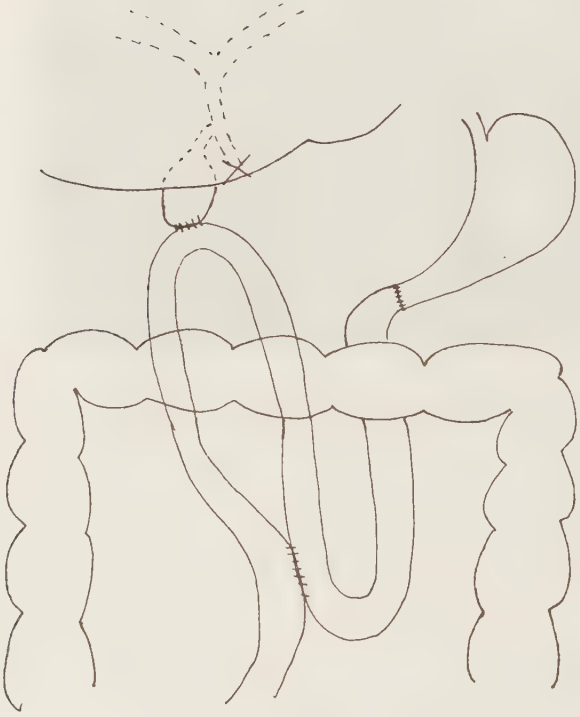


Abb. 3: Operationspräperat nach Pankreatektomie mit Darstellung des Gefäßbettes.

Abb. 4: Operationssitus bei Pankreatektomie nach Markowitz mit freipräparierter A. pankreaticoduodenalis.

c. Pankreatektomie nach Markowitz

Anatomisch bietet der Hund die Voraussetzungen zur relativ leichten Präparation der Aa. pancreaticoduodenalis sup. et inf. aus Caput bzw. Prozessus uncinatus pankreatis (52), so daß trotz totaler Pankreatektomie das Duodenum, samt aus dem Pankreas isolierter A. pancreaticoduodenalis, und der Ductus choledochus erhalten bleiben.

Laparotomie u. Präparation des Pankreasschwanzes erfolgen in oben geschilderter Weise.

Sodann, beginnend am Processus uncinatus, sorgfältige Präparation der Aa. pankreaticoduodenalis an der Vorderseite des Pankreas. Größere Gefäßäste werden zwischen Klemmen durchtrennt und ligiert, kleinere Blutungen nach stumpfer Präparation werden durch Kompression mit Gazetupfern oder durch Elektrokoagulation gestillt.

Sodann Umschlagen des Duodenum und Restpräparation auf der Rückseite in gleicher Weise.

Nach Exstirpation der Drüse wird die Unversehrtheit des Ductus choledochus und die ausreichende Blutversorgung des Duodenums kontrolliert. Mit dem Einlegen einer Drainage wird die Operation durch schichtweisen Wundverschluß beendet.

Abb. 3 u. 4 zeigen das Op.-Präparat bzw. den Op.-Situs mit freipräparierter a. pankreaticoduodenalis sup..

d. Postoperative Versorgung

Postoperativ erhielten alle Tiere 0,25 mg/kg Valium zur Sedierung. Eine postoperative Infusionstherapie war bei der duodenopankreatektomierten Gruppe - mit 1.000 - 1.500 ml dem jeweiligen Bedarf angepaßt - über 2 - 4 Tage erforderlich.

Hierbei erhielten die Tiere ab dem 2. Tage Wasser per os und ab dem 4. Tage langsam leichte Aufbaukost wie Haferschleim unter Zusatz von Meritene.

Im weiteren Verlauf bestand die Standardernährung sämtlicher Tiere aus Dosenfertigfutter, versetzt mit Meritene und 3 g Pankreon forte Granulat zur Enzymsubstitution.

Bei der zweiten Methode gestaltete sich der postoperative Verlauf im allgemeinen leichter. Nach Infusionsbehandlung über 24 Stunden erfolgte Flüssigkeitszufuhr per os und ab dem 2. Tag Aufbauen mit leichter Kost, so daß in den meisten Fällen ab 4. Tag Standardernährung erfolgen konnte.

Drainage und Verband wurden spätestens am 2. Tag nicht mehr toleriert, so daß sie dann entfernt werden mußten.

Die Fäden wurden je nach Zustand der Wunde vom 12. Tag an entfernt.

2. Inselisolierung und Transplantation

a. Aufbereitung des Organes

Nach erfolgter Pankreatektomie wurde der Ductus pankreaticus mit einer Knopfkanüle kanüliert, die Kanülierung mit einer Ligatur gesichert und die Drüse mit 20 - 40 ml, 4°C kalter Hank's-Lösung distendiert. Die interlobuläre mechanische Zerreißung und Auflockerung des Gewebes zeigt Abbildung 5.

Die weitere Zerkleinerung erfolgte bei ersten Versuchen in einem Gewebehomogenisator (Colworth Stomacher 80). Hierzu wurde das Gewebe mit der Schere in Partikel von ca. 0,5 cm^3 zerkleinert. Diese wurden zusammen mit 10 ml kalter Hank's-Lösung in einen speziellen Plastikbeutel von hoher Festigkeit eingebracht. In dem Homogenisator erfolgte anschließend durch rasches Schlagen von zwei großflächigen Platten gegen den, vor einer Metallfläche fixierten, Beutel die Gewebeteilung. So entstand eine Gewebesuspension mit durchschnittlich 0,5 mm^3 großen Partikeln. Die histologische Kontrolle zeigte jedoch, daß durch diese stumpfe Art der Zerkleinerung das Gewebe zu sehr traumatisiert wurde, so daß diese bequeme Methode verlassen werden mußte. Bei allen folgenden Versuchen wurde das Pankreas, nach vorheriger Distension, manuell mit zwei parallel geführten Scheren in möglichst kleine Stücke zerschnitten. Die Partikelgröße lag mit einem Durchmesser von 1 - 3 mm über der im Homogenisator erreichten, doch wurde durch die scharfe Zerkleinerung auch eine erheblich geringere Gewebeschädigung bewirkt.

Der so entstandene Pankreasbrei von 20 - 30 g wurde in einen mit Schliffstopfen verschließbaren Glaszylinder überführt. Anschließend schüttelten wir das Gewebe nach Zugabe von 30 ml Hank's-Lösung und 1.000 m U/g Gewebe Serva-Kollagenase kräftig im 37°C warmen Wasserbad.

Nach Ablauf von 20 min wurde der Digestionsprozeß durch Zugabe geeister Hank's-Lösung gestoppt.

Die weitgehende Reinigung der endokrinen Anteile erfolgte im unten beschriebenen Filtersystem.

Abb. 5: Distendiertes Pankreas nach Kanülierung des D. pancreaticus u. Injektion von 40 ml Hank's-Lösung.

b. Isolierung durch Stufenfiltration

Nach Erfahrungen anderer Autoren (23; 38; 58) scheint für die Transplantation eine gewisse Verunreinigung mit exokrinem Material tolerabel, so daß es nahelag, als einzigen Reinigungsschritt eine spezielle Art der Filtration zu verwenden. Zur Aufarbeitung eines Hundepankreas mußten jedoch die Dimensionen entsprechend geändert und ein weiterer Filter zur Elimination größerer, fibröser und nicht genügend verdauter Anteile eingeschaltet werden.

Das benutzte Filtersystem (Abb. 6) besteht aus 4 Glaskammerteilen von je 10 cm Innendurchmesser und 7 cm Höhe. Abdeck- und Bodenkammer verfügen über Zuführ- bzw. Ablaßhahn und gewährleisten so den kontrollierten Durchfluß eines Spülmediums. Untereinander sind die Kammern mittels stählerner Spannmanschetten fest zu verbinden bzw. voneinander zu trennen, um guten Zugang zu den einzelnen Abteilen zu gewährleisten. Für die Dichtigkeit nach außen sorgen Planschliffe von 2 cm Breite an den Verbindungsstellen und an jeder Verbindung 2 Dichtungsringe.

Als Filter zwischen den einzelnen Kammern werden Nylongewebescheiben mit definierter, konstanter Porengröße (Fa. G. Maierthaler, Köln) verwandt, welche zwischen den Dichtungsringen durch den Druck der Spannvorrichtung angepreßt werden.

Der obere Filter mit einer Porengröße von 1.000 /u dient zur Beseitigung gröberer Gewebeteile. Als Filtrat finden sich hier Pankreaskapselfragmente, Gang- und Gefäßstücke sowie unvollständig zerkleinerte bzw. ungenügend digestierte Pankreasteile. Der mittlere Filter mit 300 /u Poren erfüllt ähnliche Aufgaben in anderer Dimension; Pankreashomogenisat mit einer Partikelgröße zwischen 1.000 /u und 300 /u wird vom endgültigen Transplantationsgut separiert, um so einer Schädigung der Leber als Gastorgan vorzubeugen.

Der untere Filter mit einer Porengröße von 70 µ stellt die Sammelstelle für das zu transplantierende Gewebe dar.

Unerwünschte Verunreinigungen im Mikrobereich wie einzelne exokrine Zellen, kleinste exokrine Zellhaufen und das verdaute kollagene Gewebegerüst verlassen das Filtersystem - im Spülmedium suspendiert - nach Passage des Feinfilters durch den Ablaßhahn.

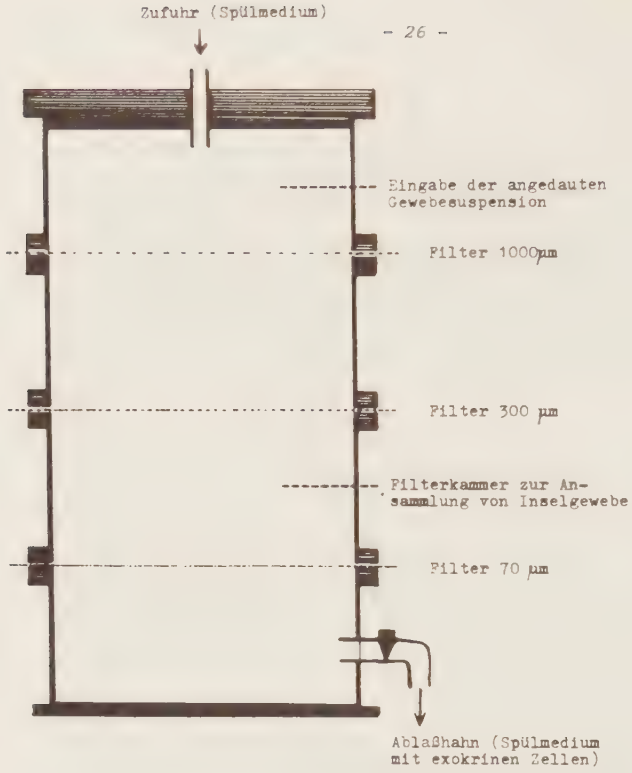


Abb. 6: Schematische Zeichnung des benutzten Filtersystemes.

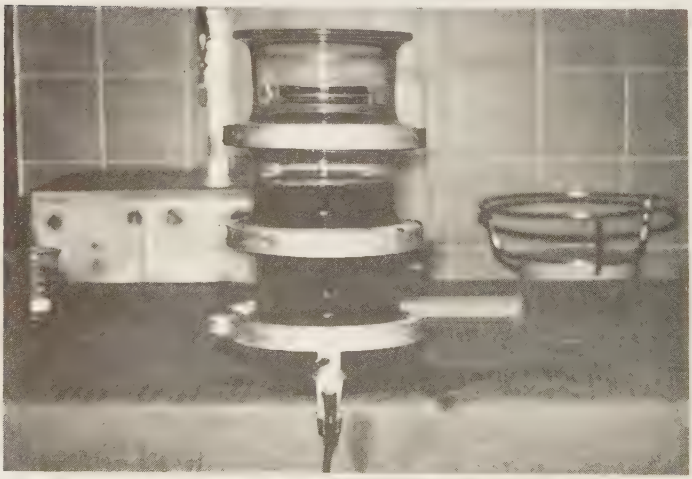


Abb. 6a: Der Stufenfilter während der Filtration der Gewebesuspension.

Die Inseln des Hundes messen zum größten Teil 75 /u - 100 /u, wobei die größten eine Dimension von 200 /u - 300 /u erreichen (17). Der Größenbereich des unteren und mittleren Filters ist so gewählt, daß sich nahezu alle morphologisch intakten, aus dem Gewebeverband gelösten Inseln zwischen diesen beiden Filtern sammeln.

Sämtliche zur Isolierung erforderlichen Materialien wurden nach üblichen Verfahren sterilisiert, wobei hitzeempfindliche Gegenstände wie Filter, Dichtungen usw. einer Gassterilisation unterzogen wurden. Alle Gerätschaften standen sodann, zu einer sterilen Isolierungseinheit zusammengefaßt, während der Operation bereit (Abb. 7). Nach Füllung des Systems mit kalter Hank's-Lösung wurde die Gewebesuspension oben eingegeben und anschließend das System mit 6 l kalter Hank's-Lösung durchspült.

Die Gewebesuspension, welche sich nach Ablassen des Flüssigkeitsspiegels oberhalb des 70 /u Filters befand, wurde mit der Pipette aufgenommen. Nach Abtrennung eines Anteils für die histologische Untersuchung brachten wir die Suspension (ca. 75 - 100 ml) zur folgenden Transplantation in eine sterile Infusionsflasche ein.

Das gesamte Verfahren nahm bis zu diesem Zeitpunkt ca. 45 min in Anspruch, wobei das Gewebe etwa die Hälfte dieser Zeit hypothermen Bedingungen ausgesetzt war. Hierdurch wurde die warme Ischämietoleranz des Pankreas deutlich unterschritten (62).

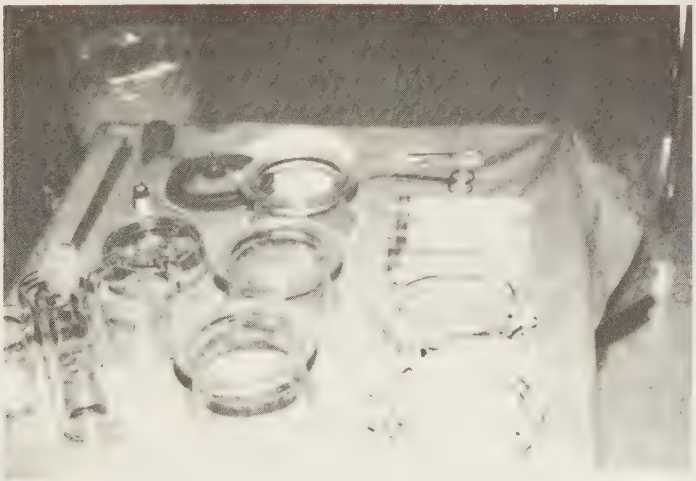


Abb. 7: Geräteeinheit zur Inselisolierung

c. Transplantation

Nach Abschluß der Pankreatektomie und Aufarbeitung der exstirpierten Drüse durch das oben beschriebene Verfahren erfolgte bei 15 Tieren eine Autotransplantation des so gewonnenen Gewebes in die Leber nach folgender Technik:

Darstellung einer Mesenterialvene und Punktion derselben unter Verwendung eines großlumigen "Cavafix"-Katheters. Anschließend Vorschieben des Katheters unter palpatorischer Kontrolle bis in die V. portae. Über diesen Zugang wurde die bereitstehende Transplantationssuspension in mäßiger Geschwindigkeit (ca. 100 ml in 15 min) in die Leber infundiert (Abb. 8).

Vor und nach der Transplantation ermöglichte das Katheter-system eine blutige Pfortaderdruckmessung nach dem Steigrohr-prinzip (s.u.) und eine Portographie nach Injektion von 15 - 20 ml Angiografin.

Während der Transplantationen kam es zu keinem Zwischenfall, die Kreislaufverhältnisse blieben stabil.

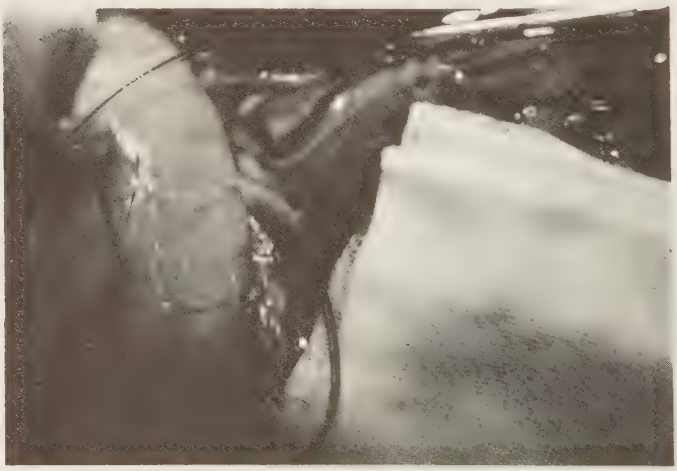


Abb. 8: Op.-Situs während der Transplantation nach Einführen eines Venenkatheters in die Pfortader.

d. Versuchsabschluß

Zum Abschluß des jeweiligen Versuches wurden die Tiere nach oben beschriebenem Verfahren narkotisiert. Nach Relaparotomie erfolgte die Inspektion der Bauchhöhle und die makroskopische Beurteilung der Leber. Hierbei ließen sich bei keinem Tier grob pathologische Befunde erkennen. Lediglich zeigte bei einigen Hunden die Leberoberfläche wenige, stecknadelkopfgroße Areale, die an Mikroinfarkte denken ließen. Diese Diagnose konnte später histologisch gesichert werden. Erneut wurde ein möglichst großlumiger Katheter via Mesenterialvene in die Pfortader vorgeschoben und hiermit der Pfortaderdruck gemessen. In einigen Fällen erfolgte danach eine Portographie (s.o.).

Zur optimalen histologischen Aufarbeitung wurde die Leber intravital über den Pfortaderkatheter mit "Bouin'scher"-Lösung perfundiert und anschließend in 1 cm schmalen Scheiben endgültig fixiert.

3. Labormethoden

Blutentnahmen erfolgten morgens nach ca. 12-stündigem Fasten. Aus einem Teil des Venenblutes, das routinemäßig zur Bestimmung der noch folgenden Laborparameter abgenommen wurde, bestimmten wir zum Teil mit dem Beckmann - Autoanalyzer, zum Teil mit dem Reflomat - Schnelltester (Fa. Boehriger) die Blutzuckerspiegel. Beide Methoden zeigten im Vergleich Abweichungen von durchschnittlich $\pm$ 10 %. Weiterhin wurde direkt prä- und postoperativ eine Blutzuckerbestimmung durchgeführt.

Am 6. postoperativen Tag wurden alle noch überlebenden Tiere einem Glucosetoleranztest unterzogen. Hierzu infundierten wir 0,5 g Glc/kg KG. Blutzuckerbestimmungen erfolgten 10, 20, 30, 60, 90 und 120 Minuten nach Glucosegabe.

Als spezifisches Parameter für die funktionell apankreatische Kohlehydratstoffwechsellage der Kontrollgruppen ist der Plasmainsulinspiegel der Versuchtiere anzusehen. Aus den Blutentnahmen für die Blutzuckerbestimmungen wurden gleichzeitig Seren für die Bestimmung der Insulinspiegel gewonnen. Die Bestimmungen erfolgten präoperativ, postoperativ und danach über eine Woche täglich.

Die Insulinbestimmung erfolgte in der Form eines Radio-Immuno-Assays (RIA) in typischer Weise. Verwendet wurde der Phadebas Insulin Test (Pharmacia Diagnostics, Uppsala). Eine optimale Bestimmung ist im Bereich von 3 - 320 µU/ml möglich. In diesem Meßbereich ergibt sich eine Genauigkeit mit einem Variationskoeffizienten um 10 %. Im Meßbereich unter 2 µU/ml steigt dieser bis über 20 % an.

Die Bestimmung der Leberenzyme SGOT, SGPT, LDH sowie von Bilirubin, der alkalischen Phosphatase und der Serumamylase erhielten wir durch Standardmethoden des klinischen Labors, wobei eine regelmäßige Kontrolle nicht durchgeführt werden konnte.

Die histologische Aufarbeitung des Lebergewebes erfolgte bei den verstorbenen Tieren nach Formalinfixierung. Bei planmäßigem Ver-

suchsabschluß (s.o.) nahmen wir die Fixierung durch Perfusion der Leber mit "Bouin'scher"-Lösung über die Pfortader vor. Zur Färbung der Präparate wurden jeweils angegebene Routineverfahren verwendet.

4. Statistik

Neben der rein graphischen Darstellung wurden die einzelnen Ergebnisse einer statistischen Analyse unterzogen. Diese "Varianzanalyse with repeated measures" wurde im Institut für Biomathematik und medizinische Statistik der Universität Düsseldorf durchgeführt. Das statistische Verfahren erklärt sich wie folgt:

Für die Analyse der Verlaufskurven wurde in Anlehnung an WINER (87) das folgende lineare Modell angesetzt:

$$y_{ijm} = \mu + \alpha_i + \pi_{mi} + \beta_j + K\beta_{ij} + \varepsilon_{ijm}$$

Dabei bezeichnet der Index i das Verfahren, der Index j den Zeitpunkt der Index m das Individuum.

Der Ausdruck y_{234} ist also der Wert des 4. Individuums zum Zeitpunkt 3 in der 2. Behandlungsgruppe.

μ bezeichnet den allgemeinen Erwartungswert, α_i den Effekt der i-ten Behandlung, β_j einen Zeiteffekt, π_{mi} den Einfluß des m-ten Individuums der i-ten Behandlungsgruppe, $(\alpha\beta)_{ij}$ die Wechselwirkung zwischen Behandlung und Zeit (Profil der Verlaufskurve) und den Versuchsfehler.

Es werden folgende Hypothesen getestet:

H_o (N) : $\alpha_i = o$ Niveauhomogenität

H_o (Z) : $\beta_j = o$ Geradlinigkeit des Zeitverlaufes

H_o (P) : $(\alpha\beta_i)_{11} = \ldots = (\alpha\beta)_{1m}$ Profilgleichheit

Die Ergebnisse dieser Varianzanalyse bestätigen in eindrucksvoller Weise die folgenden Kurveninterpretationen. Die Irrtumswahrscheinlichkeit für die drei Hypothesen bewegt sich in der

Dimension von $p \leq 10^{-5}$. Die nähere Darstellung der einzelnen Analyseergebnisse würde wegen des Umfanges den Rahmen dieser Arbeit sprengen.

IV. Ergebnisse

1. Isolationsausbeute und Histologie

Zur Ermittlung der Isolationsausbeute wurden folgende Größen bestimmt:

a) Das durchschnittliche Pankreasgewicht betrug Pg = 25 g (n = 30).

b) Das bei Probeisolierung nach Zentrifugation der Transplantationssuspension ermittelte Durchschnittsgewicht des Transplantationsgutes ergab Tg = 0,5 g (n = 15).

c) Die histologische Beurteilung aller zur Transplantation verwendeten Suspensionen (Abb. 4 u. 5) zeigte einen Inselanteil von 10 - 15 %.

d) Der durchschnittliche Anteil von Inseln am Gesamtorgan liegt beim Hund bei 1,5 %: IGA = 1,5 % (17).

e) Aus a) und d) errechnet sich als Gewicht des gesamten endokrinen Anteils im Durchschnitt IGA = 0,375 g.

f) Das durchschnittliche Gewicht der transplantierten Inseln IT ergibt sich nach b) und c) bei Annahme von mindestens 10 % Inselanteil am Transplantationsgut: IT = 0,05 g.

Aus dem oben Gesagten können wir folgern, daß mindestens (Annahme von 10 % Inseln in der Transplantationssuspension) 13,3 % aller Inseln des Organs zur Transplantation gelangten. Dieses Ergebnis wurde jedoch häufig bis zu einer Höhe von 20 % aller Inseln überschritten.

Die histologische Beurteilung des Transplantationsgutes zeigte weiterhin die weitgehend vollständige morphologische Intaktheit des Zellmaterials (Abb. 9, 10, 11 u. 12).

Eine weitere Frage war das Ausmaß der Verunreinigung der Transplantationssuspension durch Reste der Kollagenase. Trotz intensiven Spülens (s.o.) verblieben in dieser Suspension noch geringfügige Reste von Enzymaktivität. Die in-vitro-Bestimmung der Kollagenaserestaktivität ergab nur Spuren von Kollagenase, so daß eine Schädigung des Empfängerorganismus höchst unwahrscheinlich war.

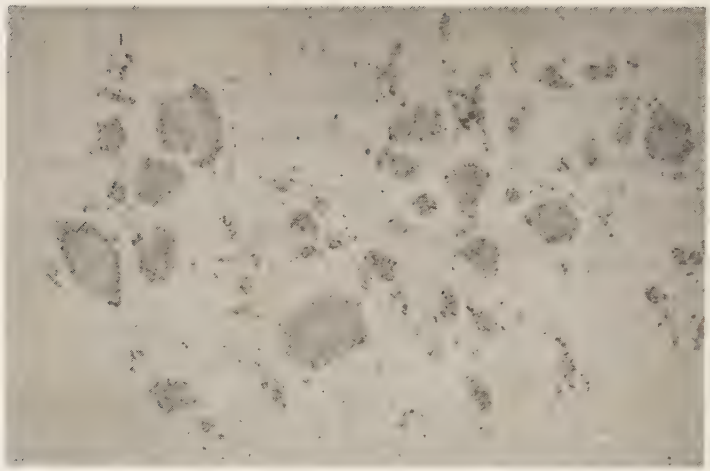


Abb. 9: Isoliertes Material mit exokrinen Zellen und 3 Langerhans'schen Inseln (HE-Färbung, ca. 250fach)

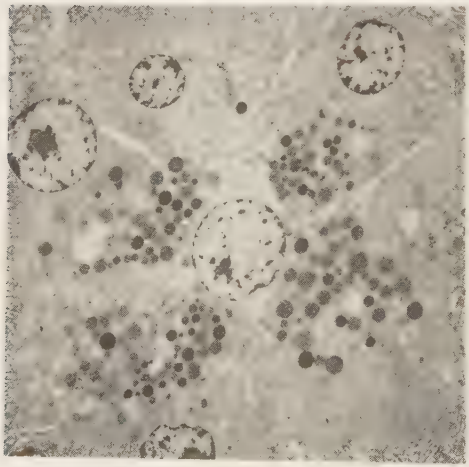


Abb. 10: Exokrine Zellen mit größeren Sekretgranula, die auf eine Lichtung zustreben (elektronenmikroskopisch)

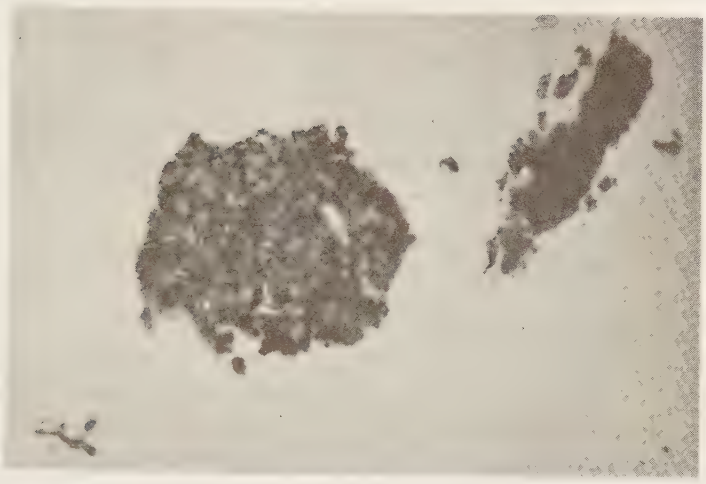


Abb. 11: Isolierte intakte Langerhans'sche Insel (HE-Färbung, ca. 400fach)

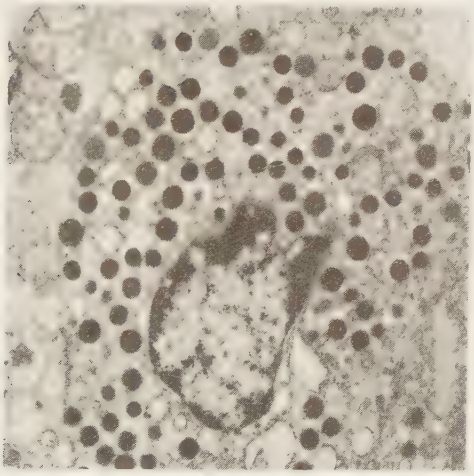


Abb. 12: Inselzellen mit Granulierungen und relativ großem Zellkern (elektronenmikroskopisch)

2. Normale Kontrolltiere

a. Blutzuckerverhalten

Um das normale Blutzuckerverhalten dieser Kontrollgruppe zu demonstrieren, wurden während 6 Tagen Blutzuckerbestimmungen in oben beschriebener Weise durchgeführt.

Abb. 13 zeigt den Verlauf der Durchschnittswerte dieser Gruppe.

b. Glucosetoleranzteste

Abb. 14 demonstriert das durchschnittliche Verhalten der normalen Kontrollgruppe nach intravenöser Glucosebelastung mit O,5 g Glc/kg KG.

c. Seruminsulinbestimmung

Ebenso wie Blutzuckerbestimmungen wurden, um das normale Verhalten der Tiere zu demonstrieren, direkte Plasmainsulinbestimmungen durchgeführt, deren durchschnittliche Spiegel über 6 Tage Abb. 15 darstellt.

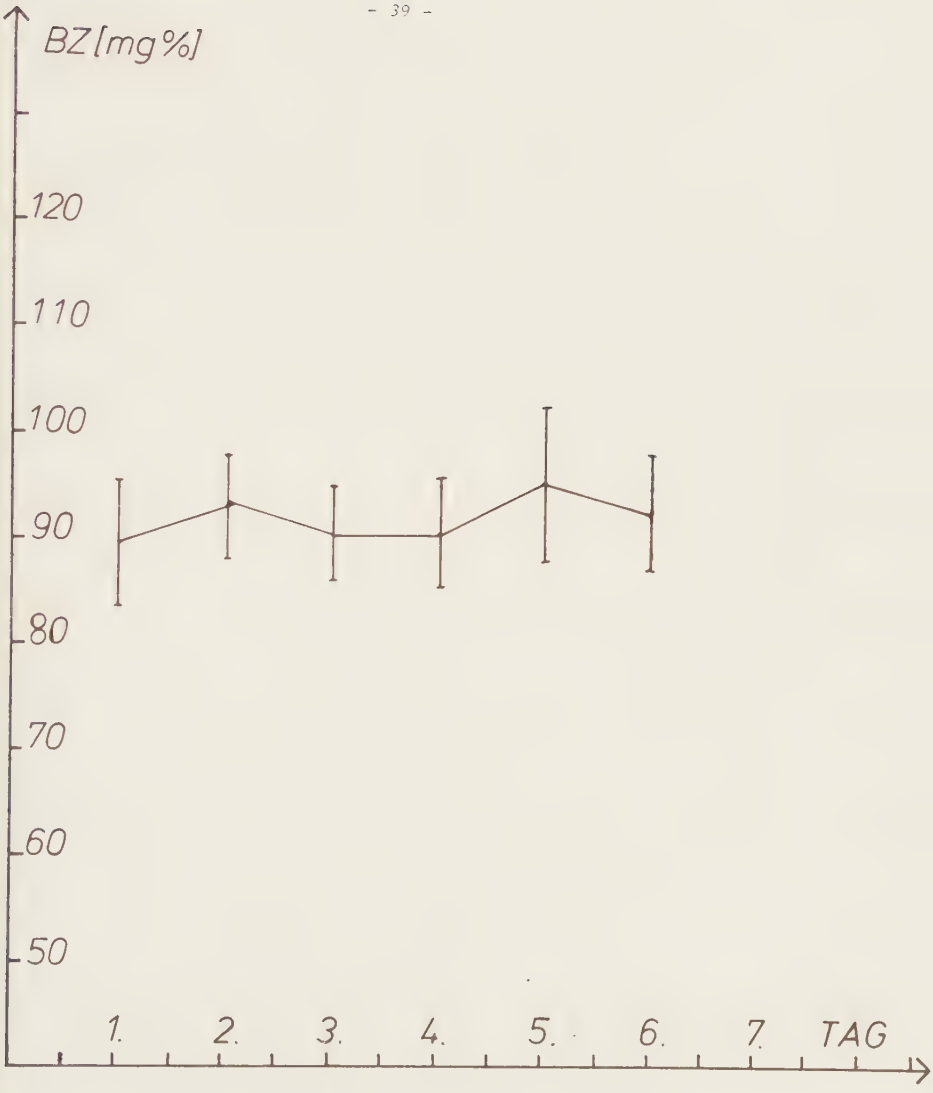


Abb. 13: Nüchternblutzuckerspiegel normaler Kontrolltiere

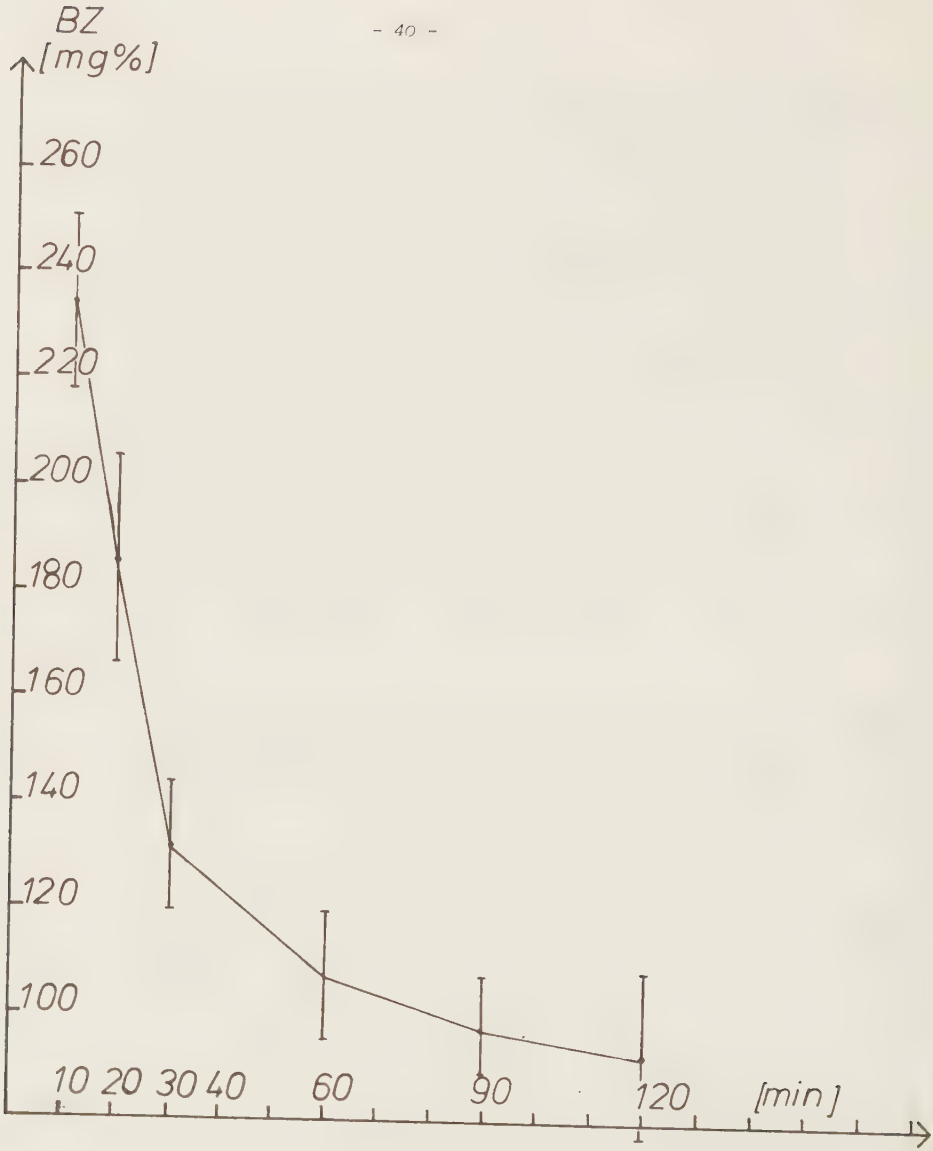


Abb. 14: Verlauf des intravenösen Glucosetoleranztestes bei normalen Kontrolltieren

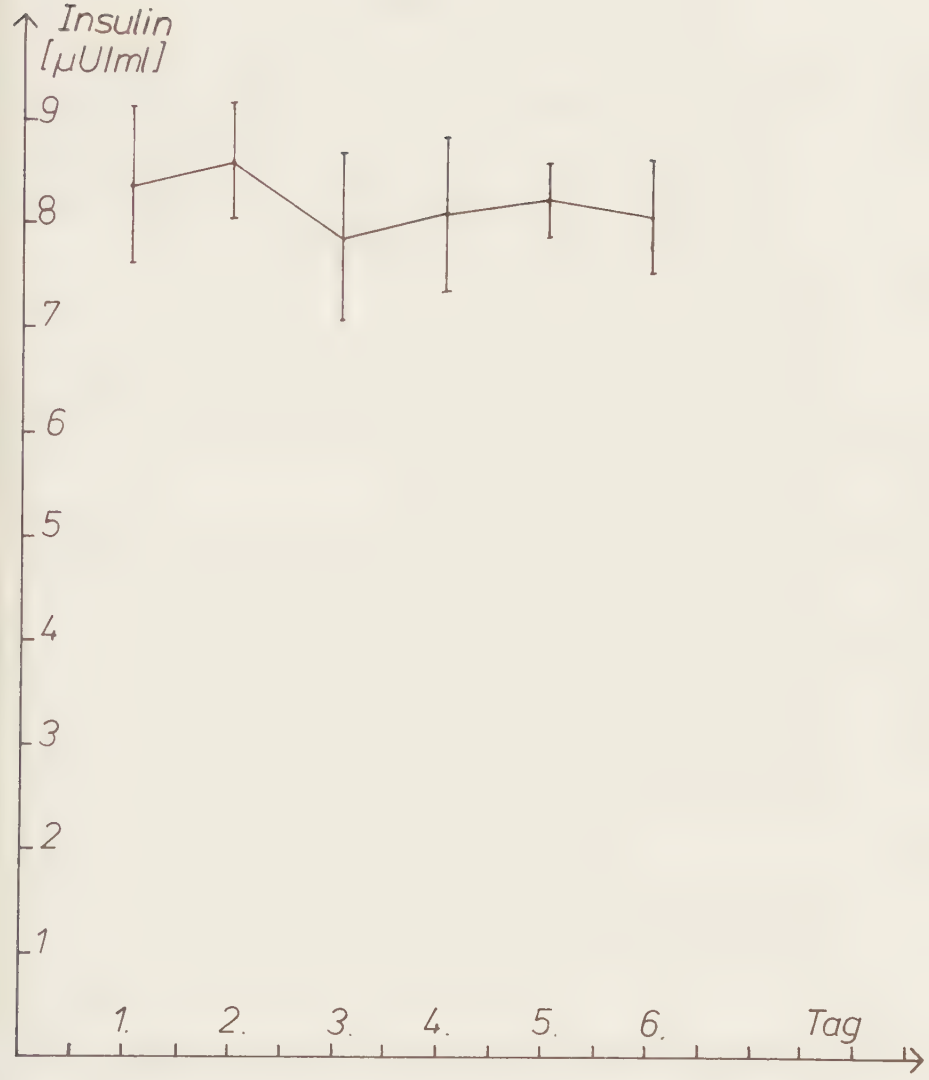


Abb. 15: Mittlere Seruminsulinspiegel normaler Kontrolltiere

3. Diabetische Kontrolltiere

a. Postoperativer Verlauf

Nachdem alle Tiere die Operation selbst überstanden, war der postoperative Verlauf nach Duodenopankreatektomie von zahlreichen und schweren Komplikationen gekennzeichnet. Die Tiere entwickelten nach dem schweren Eingriff in unterschiedlichem Ausmaß eine Atonie mit Erbrechen von aufgenommener Flüssigkeit. Hiernach waren die Hunde teilweise nur schwer wieder an normale Nahrungszufuhr zu gewöhnen. In den ersten postoperativen Tagen war außerdem die Sterblichkeit der Tiere mit 45 % sehr hoch.

Alle Tiere wurden zur Feststellung der Todesursache seziert. Hierbei fanden wir gehäuft Pneumonien, dann Ileus infolge Invagination oder Torsion im Jejunum und eine gallige Peritonitis aufgrund einer Insuffizienz der biliodigestiven Anostomose. Weiterhin verstarb je ein Tier an einem Lugenödem und im protrahierten Schock.

Häufig wurden Infektionen der Operationswunden mit Nahtdehiszenzen gesehen, welche jedoch keine Probleme aufwarfen, da die Wunden später rasch granulierten und sekundär heilten.

Alle Tiere, welche die postoperative Phase überlebten, erholten sich zunächst. Doch trotz Substitution von Verdauungsfermenten und Zusatzernährung mit hochkalorischer, leicht aufspaltbarer sogenannter "Astronautenkost" war nach 2 Wochen immer ein Gewichtsverlust von mindestens 15 % festzustellen.

Unter den Zeichen dieser Gewichtsabnahme und einer massiven Hyperglycämie und Glucosurie verstarben alle Hunde der diabetischen Kontrollgruppe bis spätestens zum 15. Tag.

Nach alleiniger Pankreatektomie (Markowitz) war der postoperative Verlauf weniger komplikationsreich, so daß wir nur 15 % der Tiere verloren. Die Häufigkeit der einzelnen Komplikationen entsprach denen der vorhergehenden Gruppe. Auch erholten sich die

Tiere etwas schneller. Im weiteren waren jedoch auch hier kaum längere Überlebenszeiten zu verzeichnen. Die Stoffwechselentgleisungen erreichten, wie im folgenden gezeigt, gleiche Ausmaße wie nach Duodenoprankreatektomie. Bis zum 17. postoperativen Tag war das letzte Tier dieser Gruppe verstorben.

b. Blutzuckerverhalten

Die Blutzuckerspiegel stiegen schon direkt postoperativ deutlich an. Bis zum 3. oder 4. Tag wurde, zum Teil noch unter Nahrungskarenz ein hohes Niveau erreicht, das sich bis zum Tode der Tiere nicht wesentlich änderte.

Abb. 16 zeigt das BZ-Verhalten der beiden diabetischen Kontrollgruppen.

c. Glucosetoleranztest

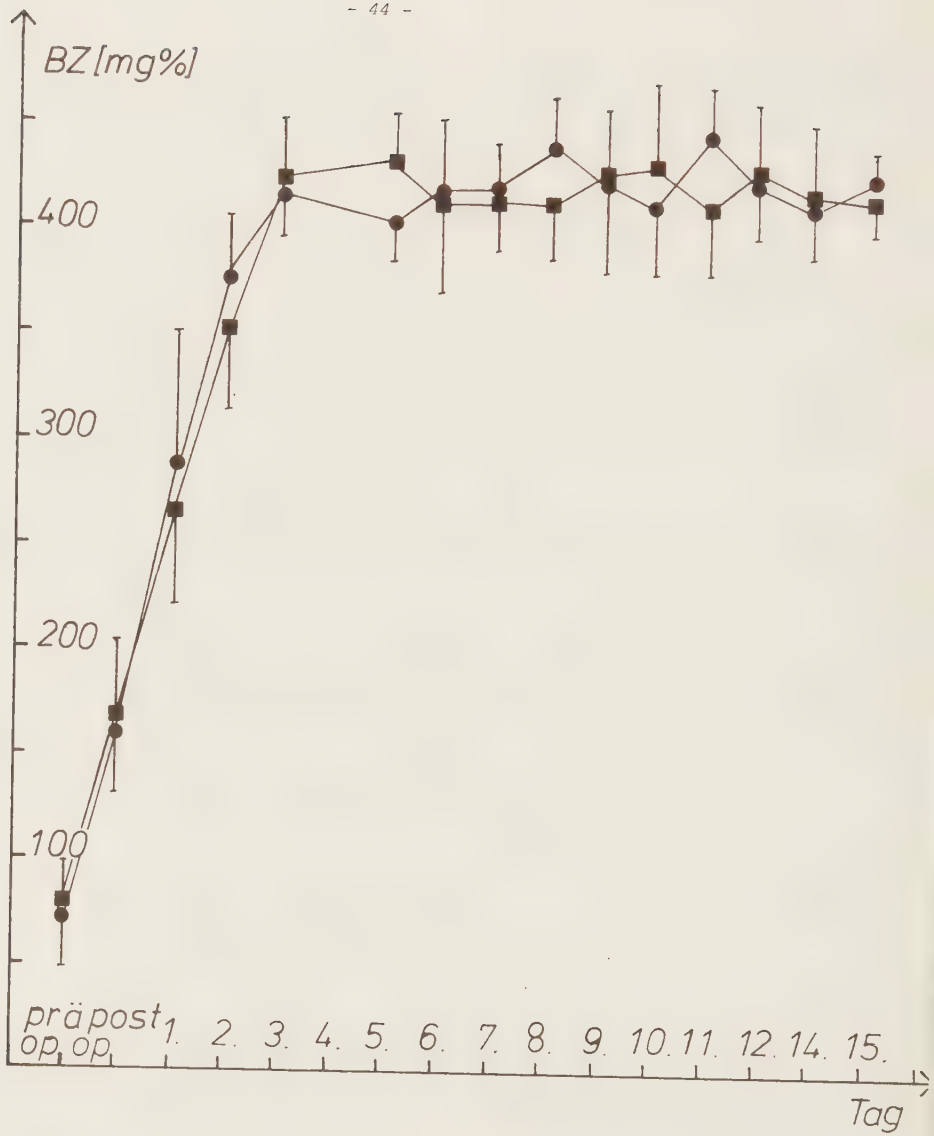
Ebenso hochpathologisch wie die Nüchternblutzuckerspiegel fielen die Glucosetoleranzteste aller diabetischen Kontrolltiere aus.

Über 120 min beobachteten wir einen äußerst geringen Abfall des Blutzuckers bei beiden Gruppen (Abb. 17).

d. Seruminsulinspiegel

Die Bestimmung des Seruminsulins ergab bei beiden Diabetesmodellen nahezu identische Werte.

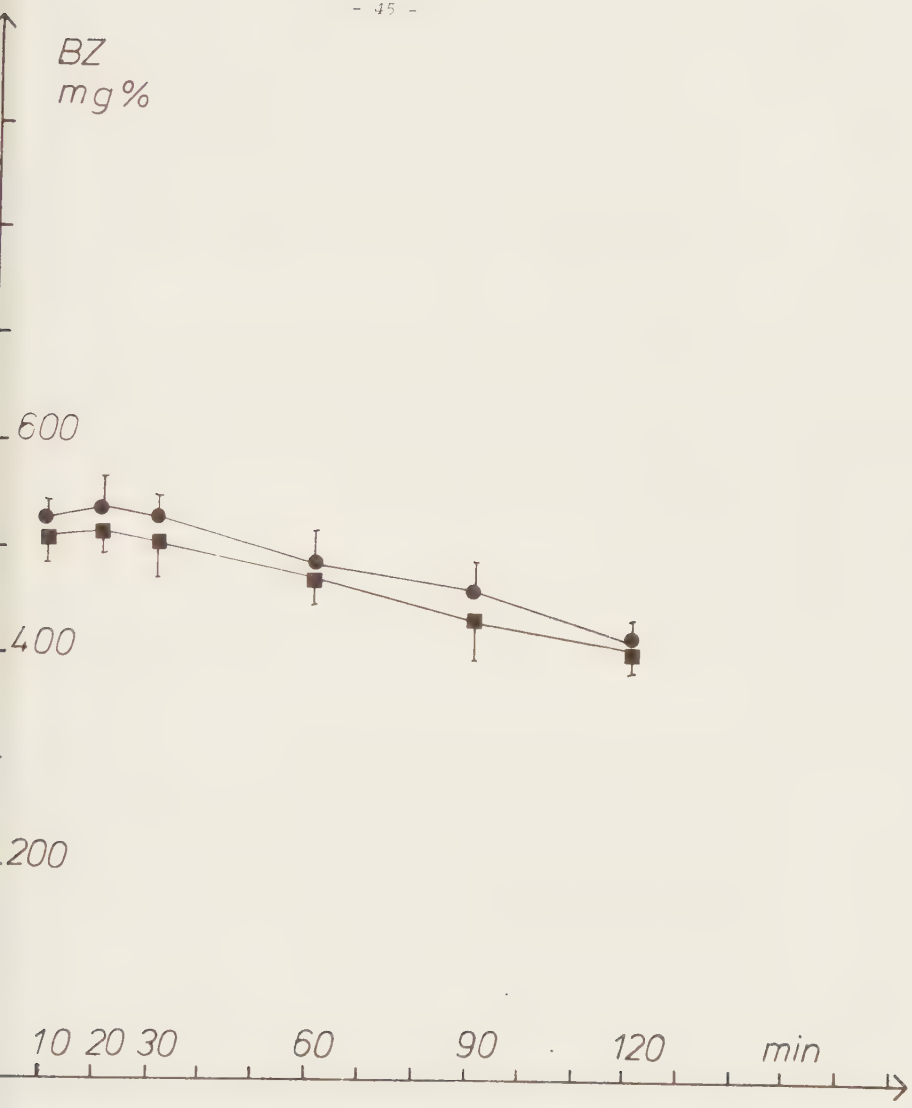
Innerhalb 36 Stunden waren die Insulinspiegel auf Werte gefallen, in deren Bereich unsere Bestimmungsmethode (s.o.) keinen exakten Nachweis mehr zuläßt (Abb. 18).



Diab. Kontrolltiere nach Duodenopankreatektomie

Diab. Kontrolltiere nach Pankreatektomie (Markowitz)

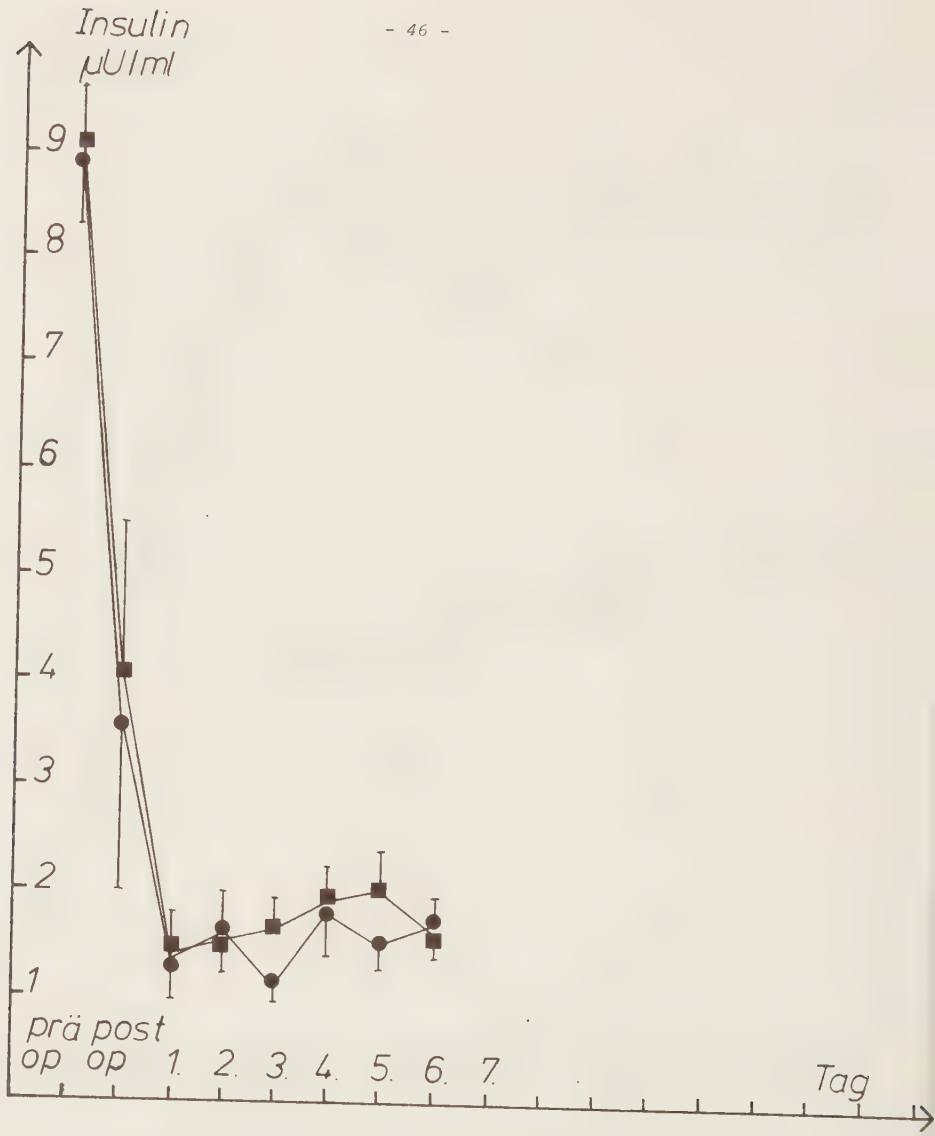
Abb. 16: Mittlere Nüchternblutzuckerspiegel der diabetischen Kontrolltiere



■ Diab. Kontrolltiere nach Duodenopankreatektomie

● Diab. Kontrolltiere nach Pankreatektomie (Markowitz)

Abb. 17: Intravenöse Glucosetoleranzteste bei den 2 diabetischen Kontrollgruppen



Diab. Kontrolltiere nach Duodenopankreatektomie

Diab. Kontrolltiere nach Pankreatektomie (Markowitz)

Abb. 18: Mittlere Seruminsulinspiegel der 2 diabetischen Kontrollgruppen

4. Autotransplantation

a. Postoperativer Verlauf

Der postoperative Verlauf der Tiere mit Autotransplantation von Langerhans'schen Inseln gestaltete sich wie in der Kontrollgruppe.

Die Häufigkeit von Komplikationen wurde durch die Transplantation nicht erhöht. Auch war die Sterblichkeit nicht höher als bei den Kontrolltieren, wie auch die durch Sektion festgestellten Todesursachen in ihrer Häufigkeit den vorher festgestellten entsprachen. Festzuhalten bleibt besonders, daß keine letale Komplikation unmittelbar von der Transplantation ausging.

Wie oben bereits erwähnt, waren auch hier häufiger Infektionen der Operationswunde zu beobachten, die jedoch nie Einfluß auf den allgemeinen Verlauf nahmen und nach ca. 20 Tagen durch Granulation sekundär verheilt waren.

Wie bereits oben erwähnt, wurde versucht, durch Substitution mit 3 g Pankreon/die und hochkalorische sogenannte "Astronautenkost" die apankreatische Resorptionsstörung möglichst gering zu halten und eine Kachexie möglichst zu vermeiden. Doch war schon in den ersten beiden postoperativen Wochen ein Gewichtsverlust von 15 - 20 % des Ausgangsgewichtes festzustellen. Auch in der Folgezeit verloren die Tiere, wenn auch bedeutend langsamer, ständig an Gewicht.

Alle Tiere zeigten auch in ihrem Stuhlverhalten die Zeichen der massiven exokrinen Pankreasinsuffizienz mit typisch massigen, fettigen und häufigen Kotabsetzungen.

Mirkovitch beendete daher nach 10 Wochen seine Versuche (59).

Durch genannte Maßnahmen gelang es, die auftretende Kachexie hinauszuzögern, so daß die einzelnen Versuchsabschlüsse bei Erreichen von ca. 40 % Gewichtsverlust nach 40 - 80 Tagen vorgenommen wurden. Bei zwei Tieren wurde, trotz guter Konstitution, der Versuch erst nach Ablauf von 6 Monaten beendet.

b. Blutzuckerverhalten

Abb. 19 zeigt den Verlauf der Mittelwerte bis zum Abschluß des Versuches oder bis zum Versterben des jeweiligen Tieres. Bei allen länger überlebenden Tieren erfolgte die BZ-Kontrolle ab dem 40. Tag in größeren jedoch höchstens wöchentlichen Abständen. 4 Tiere, die bis zum 5. postoperativen Tag verstarben, werden nicht erfaßt.

c. Glucosetoleranzteste

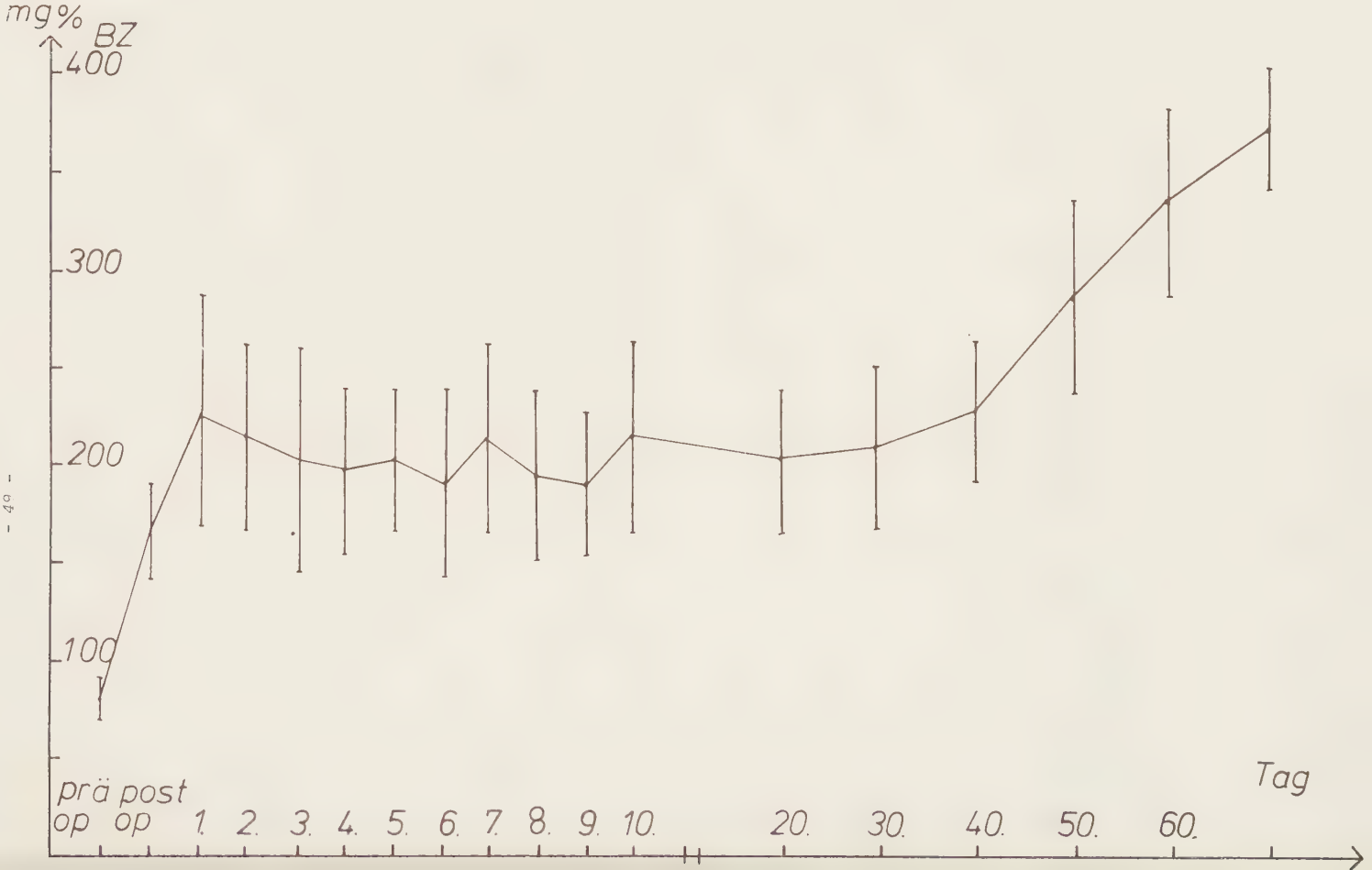
Bei allen Tieren mit Autotransplantation von Langerhans'schen Inseln wurden jeweils am 10. - 20. postoperativen Tag und bei allen länger überlebenden Tieren am Versuchsende intravenöse Glucosetoleranzteste vorgenommen.

Abb. 20 und 21 zeigen das durchschnittliche Verhalten der transplantierten Tiere auf die Glucosebelastung am 20. Tag bzw. bei Versuchsabschluß.

d. Seruminsulinspiegel

Die Bestimmung des Seruminsulins erfolgte bei den transplantierten Tieren direkt prae- und postoperativ, weiterhin während der 1. Woche täglich und anschließend in Abständen von einigen Tagen bis zu einer Woche.

Abb. 22 demonstriert das durchschnittliche Verhalten der Insulinspiegel nach Autotransplantation.


mg%
BZ
400
300
200
100
prä op
post op
1.
2.
3.
4.
5.
6.
7.
8.
9.
10.
20.
30.
40.
50.
60.
Tag

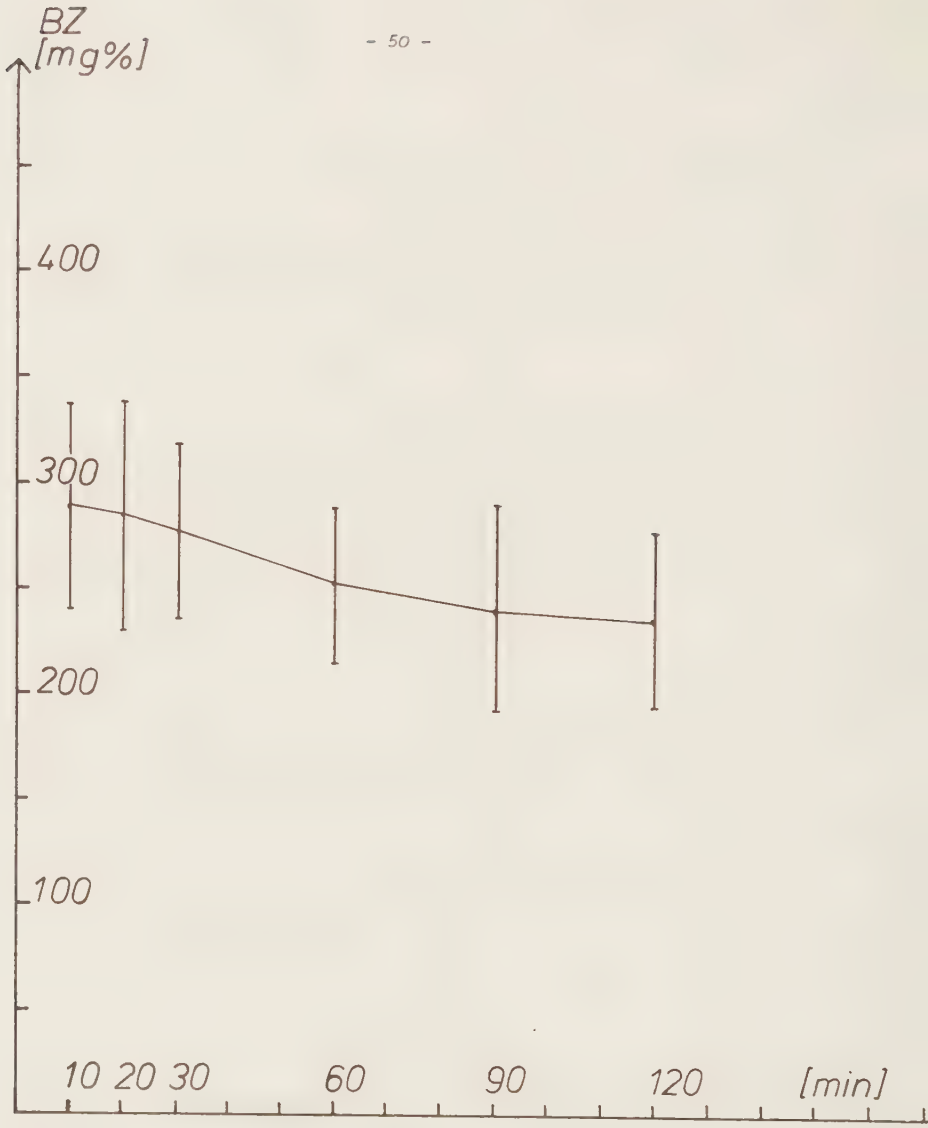


Abb. 20: Intravenöse Glucosetoleranzteste nach totaler Pankreatektomie und und Autotransplantation von Langerhans'schen Inseln am 20. post-operativen Tag

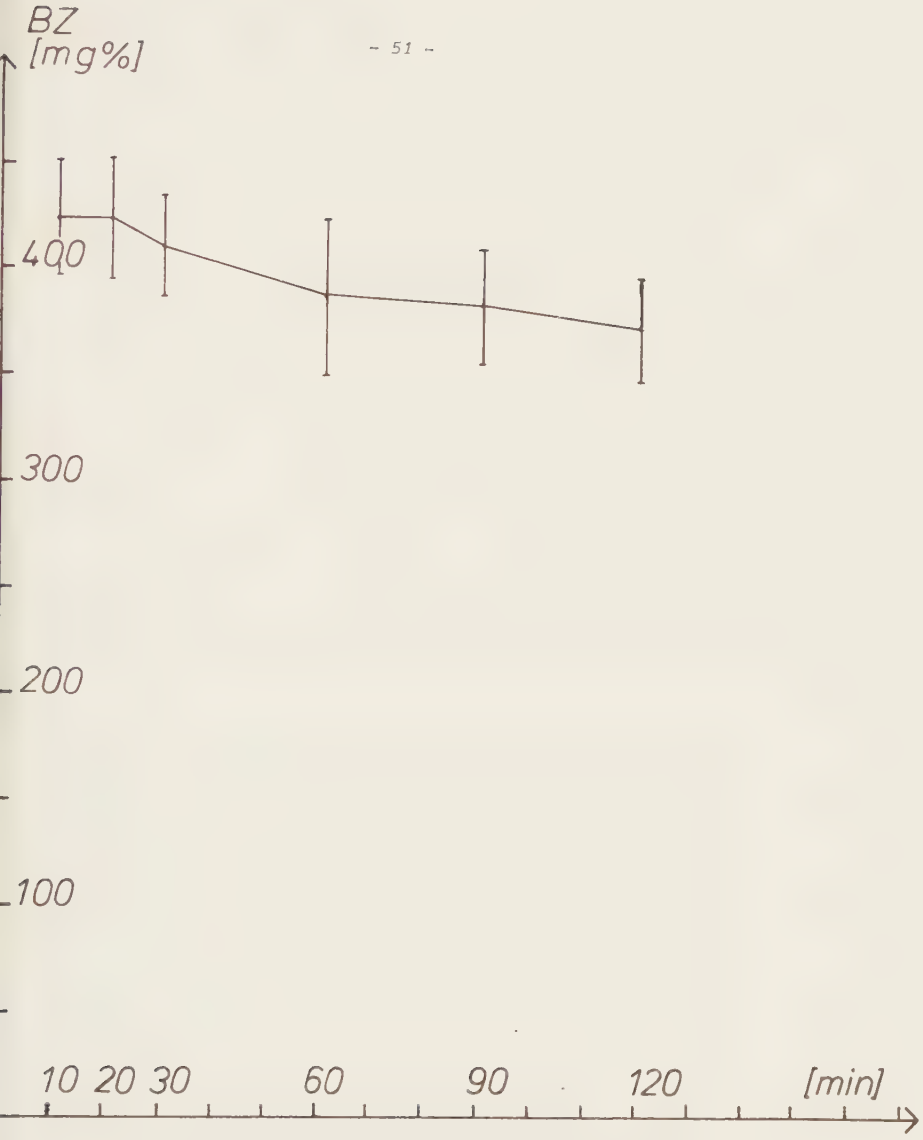


Abb. 21: Intravenöse Glucosetoleranzteste nach totaler Pankreatektomie und Autotransplantation von Langerhans'schen Inseln bei Versuchsabschluß

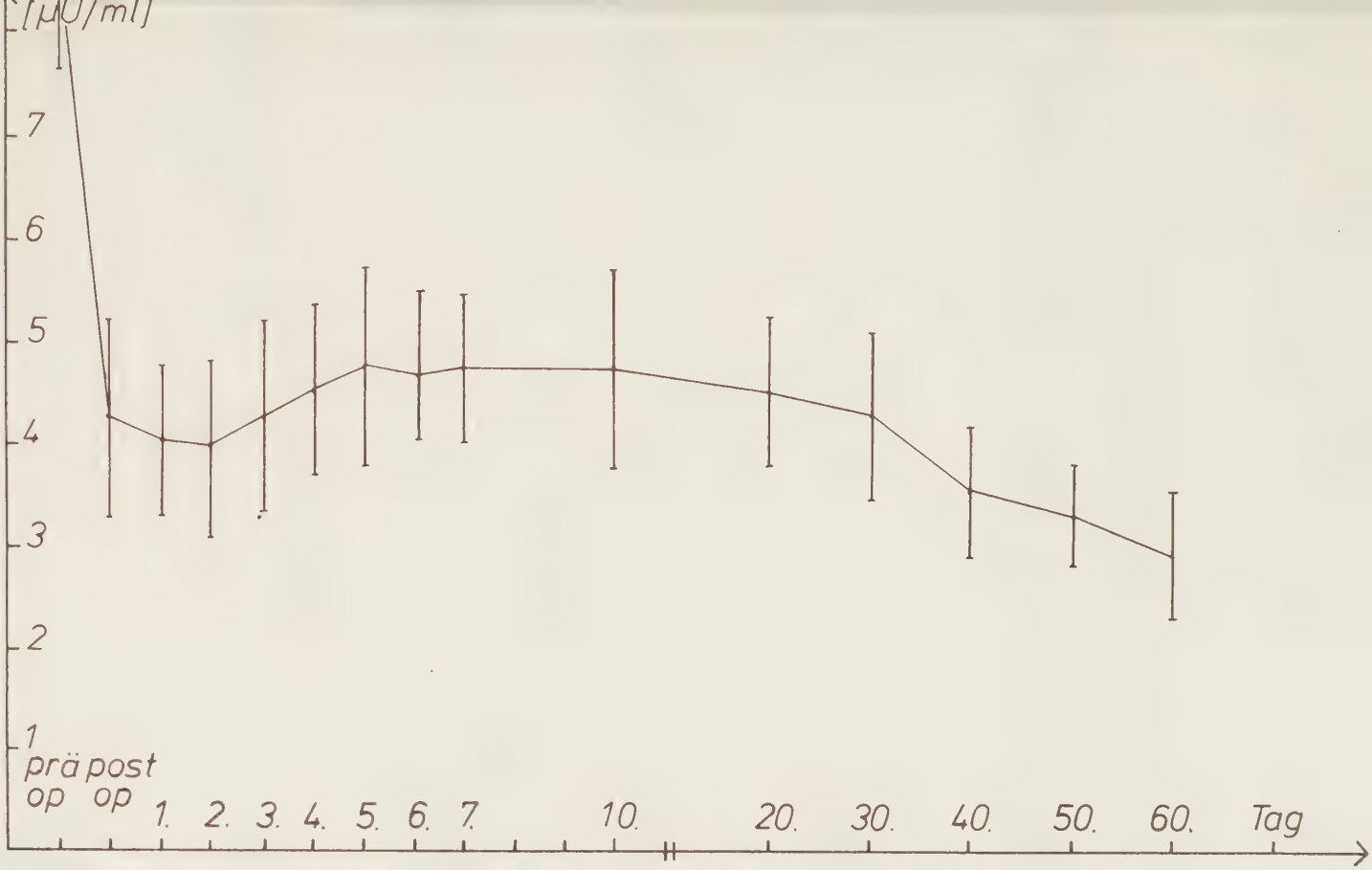


Abb. 22: Mittlere Seruminsulinspiegel nach totaler Pankreatektomie und Autotransplantation von Langerhans'schen Inseln

e. Leberfunktionsdiagnostik

Die Leberwerte wurden im klinischen Labor routinemäßig mehrmals kontrolliert.

Von den Leberenzymen war die SGOT und die SGPT nur während der ersten postoperativen Tage deutlich erhöht. Die SGPT blieb darüber hinaus noch bis zu 2 Wochen nach der Transplantation bis auf das 2-fache des Normalwertes erhöht.

Nennenswerte Anstiege der alkalischen Phosphatase, der LDH und des Bilirubins waren nicht festzustellen.

Die Serumamylase zeigte sich am 1. und 2. postoperativen Tag deutlich erhöht, fiel jedoch danach rasch bis unter die Norm ab. Wegen der Aufwendigkeit der Bestimmung wurde jedoch auf regelmäßige Mitbestimmung der Amylase verzichtet, um das Kliniklabor nicht zu überlasten.

Abb. 23 gibt in graphischer Form das Verhalten der Leberenzyme bis zur 4. Woche nach Operation wieder. Als Normalwerte sind jeweils die präoperativen Werte aufzufassen. Es sind die Mittelwerte angegeben, denen unterschiedliche Anzahlen von Werten zugrunde liegen (n = 3 - 12).

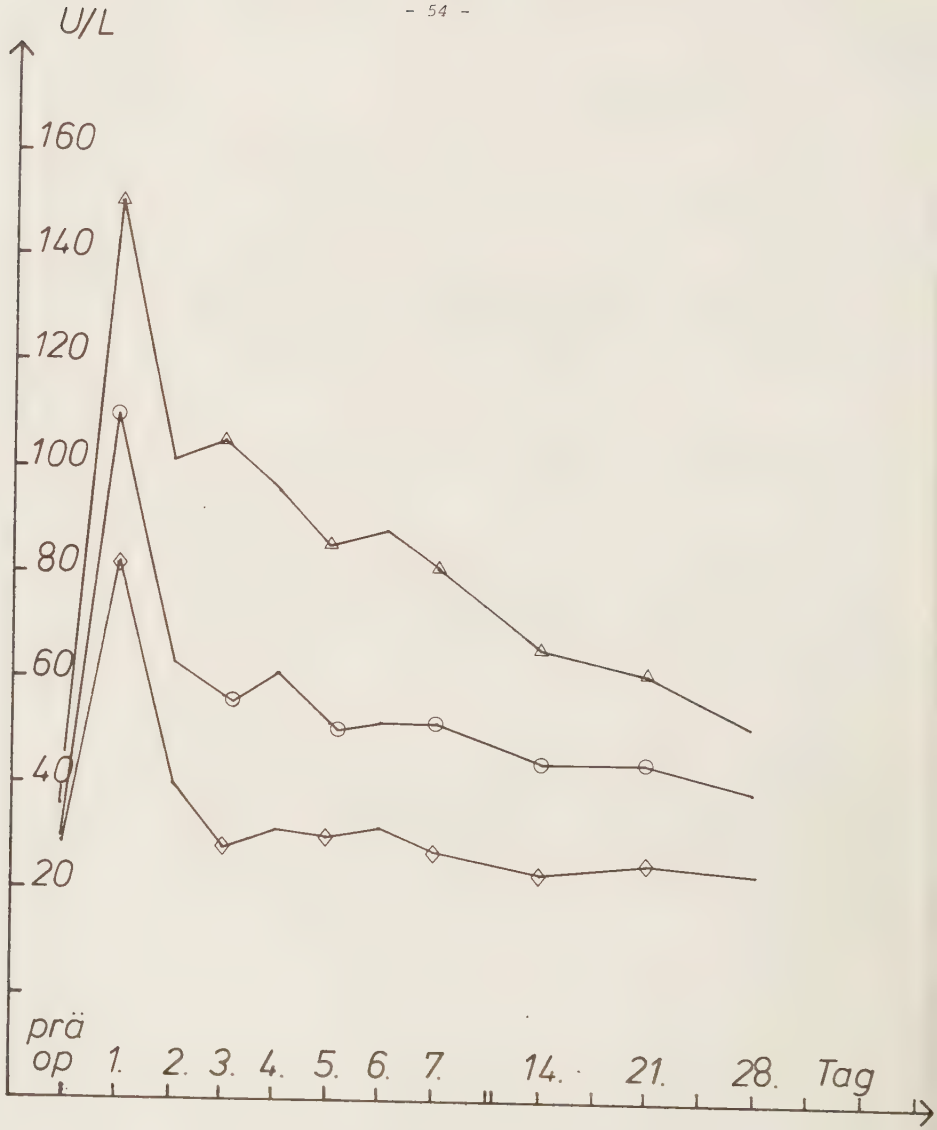


Abb. 23: Leberenzymverhalten nach Pankreatektomie und Autotransplantation von Langerhans'schen Inseln

Die Kontrolle des Pfortaderdruckes ergab folgendes:

Der normale Druck vor der Transplantation lag im Mittel bei 7,0 cm H_2O und stieg im Anschluß auf Werte zwischen 8,5 und 22,0 cm H_2O, im Mittel auf 13,5 cm H_2O an. Bei Versuchsabschluß konnte bei allen Tieren ein nur leicht erhöhter Druck bis höchstens 15 cm H_2O (2 Fälle), ansonsten 8 - 12 cm H_2O gemessen werden.

Bei sämtlichen röntgenologischen Darstellungen des intrahepatischen Pfortadersystemes, die direkt nach Transplantation und bei Versuchsabschluß angefertigt wurden, stellten sich im Vergleich zu den Portographien vor Transplantation keine gröberen Pfortaderabbrüche bzw. keine nachweisbaren Obstruktionen im intrahepatischen Pfortadernetz dar.

Abb. 24 zeigt eine Aufnahme bei Versuchsabschluß ca. 60 Tage nach der Transplantation.

Abb. 24

f. Histologie

Die Abb. 25 zeigt zunächst Gewebe eines Tieres, welches 4 Tage nach Pankreatektomie und Autotransplantation infolge Pneumonie verstarb. Hier sieht man eine intakte Insel reaktionslos in einer Portalvene. Ebenso findet man auch exokrines Material in den Gefäßlumina (Abb. 26).

Die Aufarbeitung des Lebergewebes 6 Wochen bis 5 Monate nach der Transplantation sollte dann Aufschluß darüber geben, wie das transplantierte Gewebe eventuell eine Änderung erfährt, und welche Veränderungen vom Transplantationsort ausgehen.

Zunächst war auffallend, daß bei der Durchmusterung der Leberpräparate von den Tieren, die an postoperativen Komplikationen verstarben, Inselgewebe ohne Mühe auffindbar war, während bei Versuchsabschluß nach über 6 Wochen Versuchsdauer die Inseln nur noch relativ spärlich in den Präparaten zu erkennen waren.

Sehr häufig finden sich thrombotische Auflagerungen und später fibrotische Umbauvorgänge an den Transplantaten. Die Abb. 27 zeigt bei einem Tier nach 8 Wochen Versuchsdauer 2 Inseln mit thrombotischem Material und Kernresten als Zeichen eines lytischen Zellunterganges. Bei diesem Tier bestand nach Autotransplantation über 4 Wochen weitgehend Normoglycämie, wonach die Blutzuckerwerte allmählich bis über 300 mg % anstiegen. Die Abb. 28 zeigt vom gleichen Tier vitale exokrine Anteile mit Kapillarisierung in der Portalvene. Dazu findet man eine wabige Auflockerung der Leberzellen in der Umgebung exokriner Emboli als Zeichen von Zirkulationsstörungen oder direkter Auswirkung der exokrinen Zellen.

Durch die Organisationsvorgänge an den umgebenden thrombotischen Auflagerungen und an den Inseln selbst kommt es zur Kapillarisierung. Die Abb. 29 zeigt Kapillaren zwischen den transplantierten Inselzellen.

Die Periportalfelder werden mit zunehmender Versuchsdauer stärker mit Bindegewebe durchsetzt und in einzelnen Lebervenen finden sich später nur noch kollagene Narben nach Organisation von Thromben und wahrscheinlich auch vollständiger Organisation von Inselzellen (Abb. 30).

Abb. 25: Intakte Langerhans'sche Insel 4 Tage nach Autotransplantation in einer Portalvene (HE-100fach)

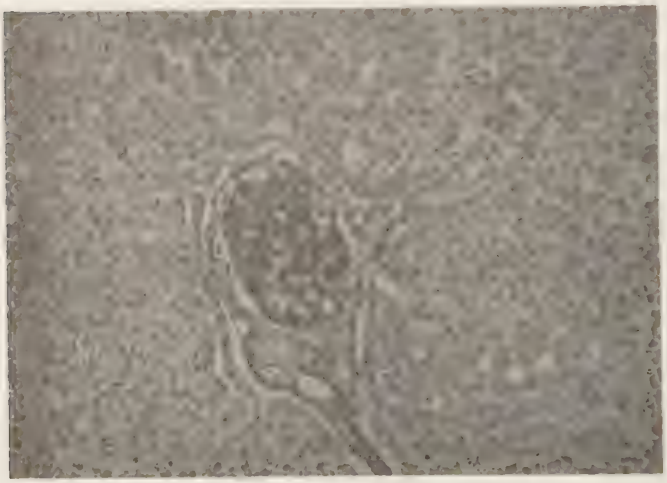


Abb. 26: Exokriner Embolus bei demselben Tier wie oben (HE-100fach)

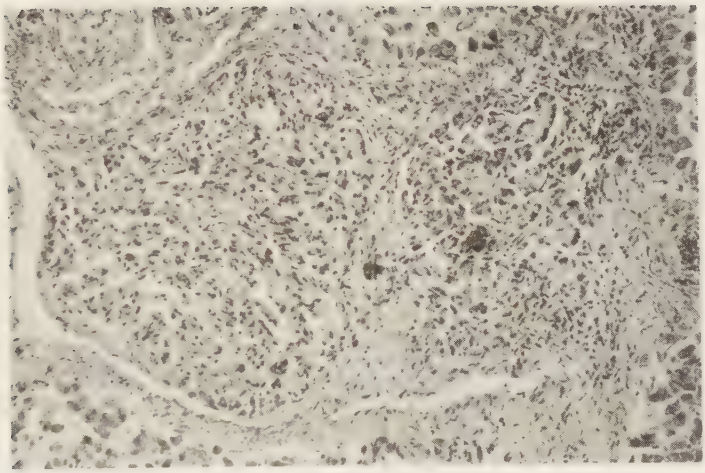


Abb. 27: 2 Inseln im Stadium der Lysis mit thrombotischem Material ca. 8 Wochen nach Autotransplantation (HE-100fach)

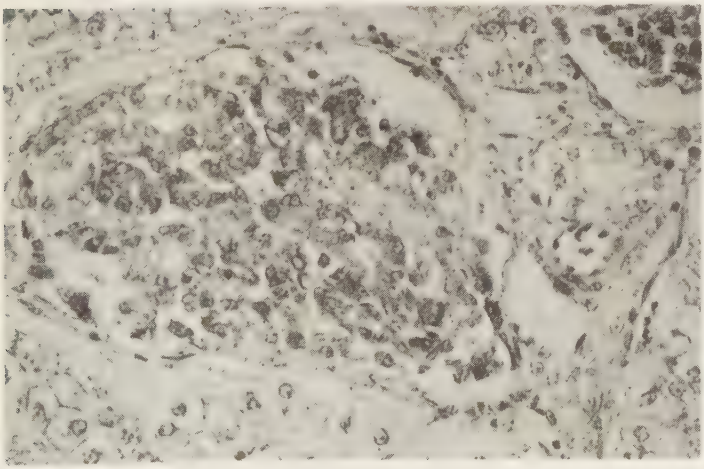


Abb. 28: Vitale exokrine Anteile bei demselben Tier (HE-250fach)

Abb. 29: Inselrest im Zustand der Organisation mit Rekapillarisierung ca. 6 Wochen nach Autotransplantation (HE-250fach)

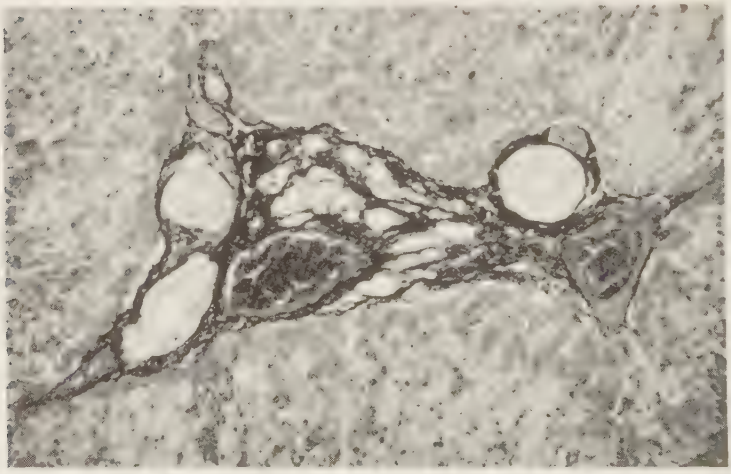


Abb. 30: Narbig verändertes Periportalfeld nach Organisation von Thromben ca. 20 Wochen nach Autotransplantation von Langerhans'schen Inseln (Elastica v. Gieson, 250fach)

5. Statistische Auswertung

a. Blutzuckerverhalten

Die Abb. 31 zeigt im Vergleich das durchschnittliche Blutzuckerverhalten der 4 untersuchten Gruppen. Hierbei steht die Gruppe

A für 8 duodenopankreatektomierte Kontrolltiere

B für 7 pankreatektomierte Kontrolltiere

C für 8 normale Kontrolltiere

D für 15 apankreatische Tiere mit Autotransplantation von Langerhans'schen Inseln.

Aus dieser Abbildung entnimmt man:

Gruppe A und B sind sowohl im Niveau homogen wie auch im Profil identisch. Das heißt, daß beide Methoden ohne Unterschied als diabetisches Modell anzuerkennen sind.

Im Gegensatz hierzu steht der Kurvenverlauf der Gruppe D, welche bei weitem kein so hohes Blutzuckerniveau erreicht. Auch bietet das Kurvenprofil dieser Gruppe als Ausdruck für den Zeiteffekt ein deutlich anderes Bild als das der Gruppen A und B. Diese Ergebnisse sind hoch signifikant ($p \leq 10^{-5}$) und zusammengenommen bestätigen sie statistisch den Transplantationserfolg.

Doch wie der Vergleich mit der normalen Kontrollgruppe C zeigt, ist der Transplantationseffekt nicht so groß, daß das Blutzuckerverhalten wieder vollständig normalisiert wird.

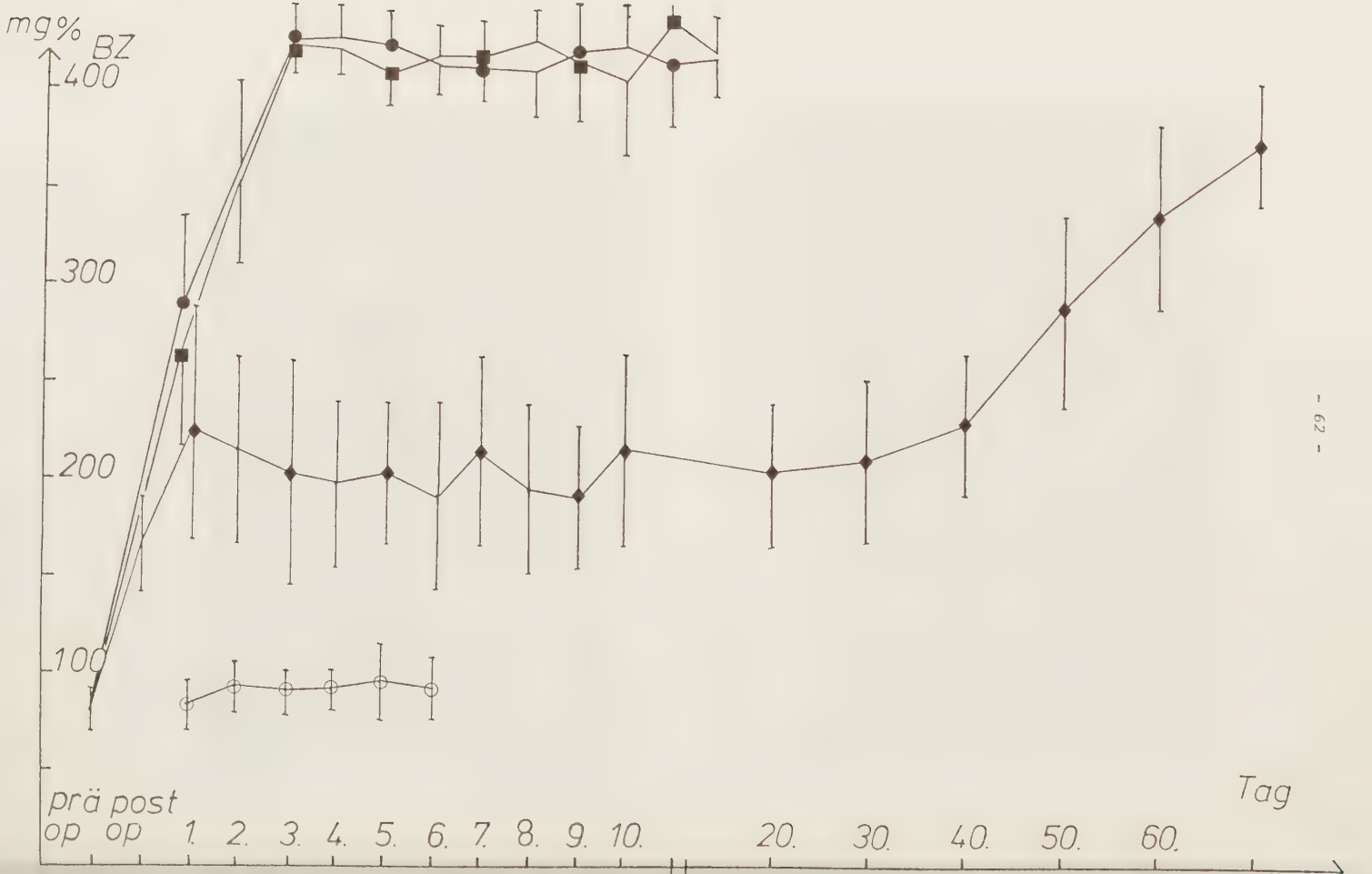

mg%
BZ
400
300
200
100
prä
op
post
op
1.
2.
3.
4.
5.
6.
7.
8.
9.
10.
20.
30.
40.
50.
60.
Tag

Abb. 31 : Mittlere Nüchternblutzuckerspiegel aller Gruppen im Vergleich

diab. Kontrolltiere nach totaler Pankreatektomie (Markowitz)

diab. Kontrolltiere nach Duodenopankreatektomie

normale Kontrolltiere

totale Pankreatektomie und Autotransplantation von isolierten Inseln

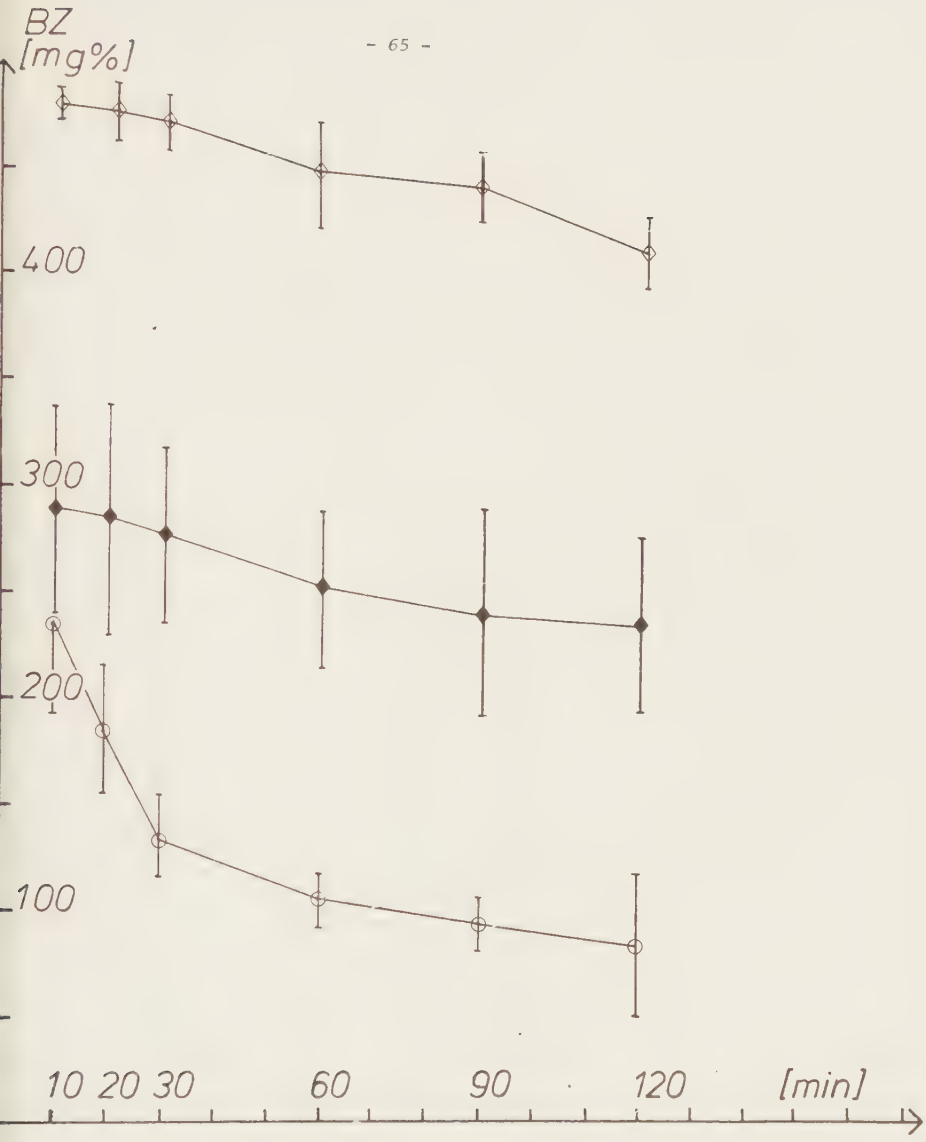
b. Glucosetoleranzteste

Die Abb. 32 beschreibt das unterschiedliche Verhalten der unter a. genannten 4 Gruppen nach intravenöser Glucosebelastung. Auch diese Ergebnisse bewegen sich auf einem Signifikanzniveau von $p \leq 10^{-5}$ und entsprechen weitgehend dem Effekt der Transplantation auf die Nüchternblutzuckerspiegel.

c. Seruminsulin

Auch das Resultat der direkten Insulinbestimmung scheint in Kurvenniveau und -profil mit dem der entsprechenden Nüchternblutzuckerbestimmung im Zusammenhang zu stehen.

Eine zumindest basale Insulinsekretion ist auch nach Pankreatektomie und Inseltransplantation nachzuweisen. Dieses wird in Abb. 13 dokumentiert.



◇ diabetische Kontrolltiere

◆ 20 Tage nach Pankreatektomie u. Autotransplantation von Inseln

○ normäle Kontrolltiere

Abb. 32: Intravenöser Glucosetoleranztest, mittleres Verhalten aller Gruppen im Vergleich

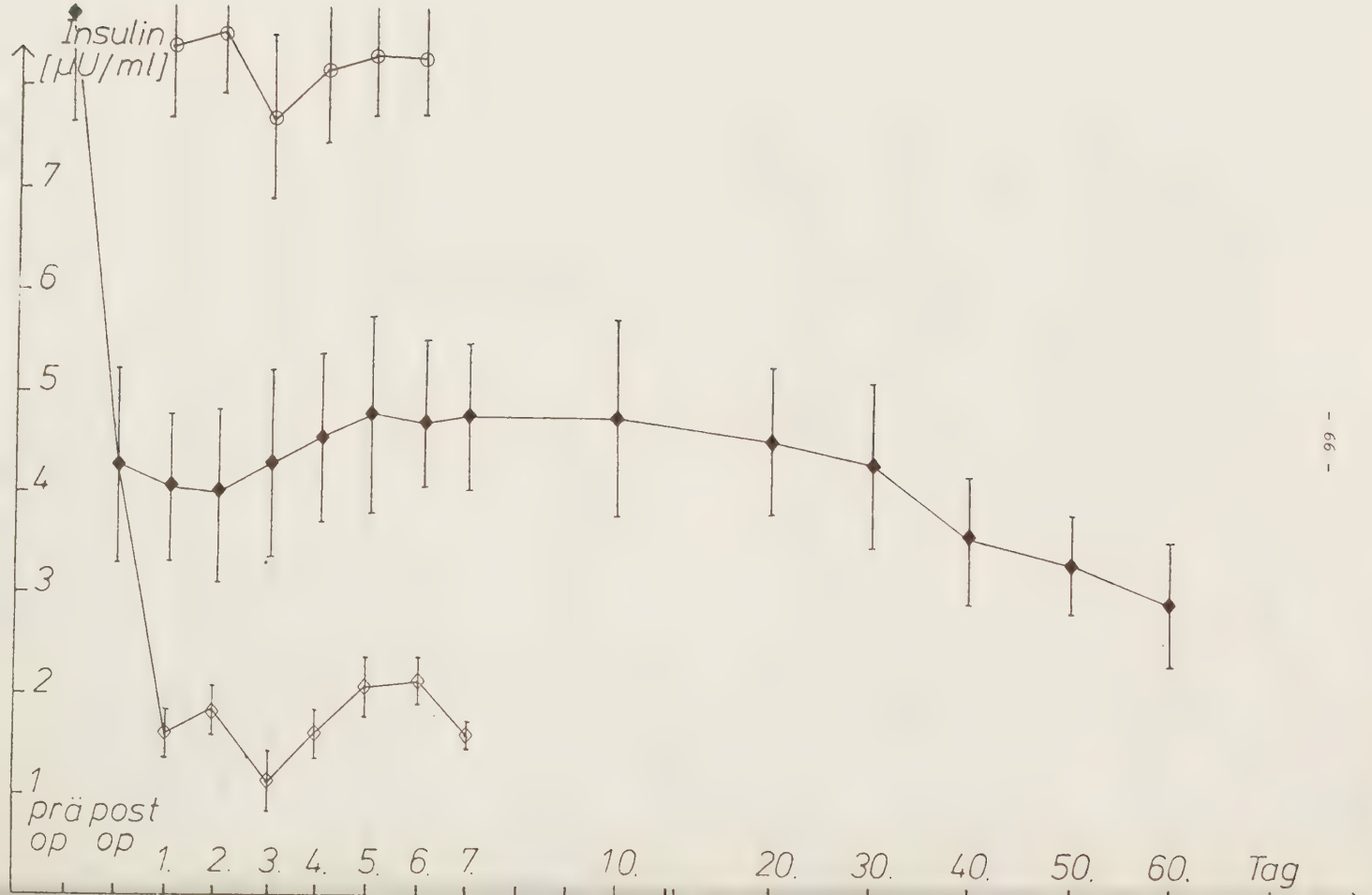

Insulin
[µU/ml]
7
6
5
4
3
2
1
prä op
post op
1.
2.
3.
4.
5.
6.
7.
10.
20.
30.
40.
50.
60.
Tag

Abb. 33 : Mittlere Seruminsulinspiegel aller Gruppen im Vergleich

normale Kontrolltiere

Tiere nach Pankreatektomie und Inselautotransplantation

diab. Kontrolltiere nach totaler Pankreatektomie

V. Diskussion

Nach zahlreichen experimentellen Erfolgen und auch einigen klinischen Erfahrungen muß die Transplantation von isolierten Pankreasinseln als Alternative zur Organtransplantation mit vaskulärem Anschluß bei dem Versuch angesehen werden, das insuffizient gewordene "Inselorgan" zu ersetzen.

Den bisher nicht befriedigenden Ergebnissen der Inseltransplantation, die zum großen Teil auf eine unzureichende Ausbeute bei der Isolierung zurückzuführen sind, steht die geringe Komplikationsrate dieser Methode gegenüber. Die bisher häufiger durchgeführten ortho- oder heterotopen Transplantationen von Pankreas oder von Pankreassegmenten sind mit einer hohen Rate gefährlicher postoperativer Komplikationen belastet (32; 44; 46).

Trotz bisher nachgewiesen besserer endokriner Funktion der Organtransplantate gibt diese Tatsache Anlaß zu weiterem Bemühen in der Optimierung der Inseltransplantation, speziell der Isolierung von Inseln, von deren Anzahl der Transplantationserfolg in hohem Maße abhängig zu sein scheint (28; 30).

1. Inselisolierung

Wie oben erwähnt, stellt die Isolierung einer ausreichenden Anzahl von intakten Inseln im Tierexperiment aus den Pankreata höherer Säugetiere wie auch bei der klinischen Anwendung aus menschlichem Pankreas das Hauptproblem der Inseltransplantation dar (28; 58; 84).

Allen Trennverfahren gemeinsam ist die mechanische Zerkleinerung des Pankreas und die anschließende Digestion mittels Kollagenase, durch welche die Inseln aus ihrem Gewebsverband gelöst werden sollen. Hierbei gilt es, Schädigungen des späteren Transplantationsgutes möglichst zu vermeiden. Dazu muß ein Optimum aus den verschiedenen Möglichkeiten der Gewebezerkleinerung und der zeitlichen Bemessung der anschließenden emzymatischen Andauung gefunden werden.

Versuche der technischen Erleichterung und Verbesserung der Zerkleinerung brachten nicht das gewünschte Ergebnis.

Zwar gelang es mittels des oben beschriebenen Homogenisators, sehr kleine und gleichmäßige Partikel zu erzeugen, welche sehr gutem Enzymkontakt unterlagen, doch entstanden bei dieser Form der Aufbereitung zu viele Zelltrümmer. Weitaus weniger traumatisierend wirkte, wenn auch mühsamer, das scharfe Zerteilen der Drüse durch 2 parallel geführte Scheren. Allerdings mußten hier größere und ungleichmäßigere Pankreasfragmente in Kauf genommen werden. Wie von Lacy und Scharp (42;76) angegeben, erbrachte die vorherige retrograde Distension über den Pankreasgang eine Verbesserung der Ausbeute.

Die endgültige Auslösung der Inseln aus dem Gewebeverband erfolgte durch Kollagenaseandauung. Die optimale Einwirkzeit wurde von Untersuchern wie Andersson, Henrikson, Kretschmer u.a. (2; 20; 30; 39) mit 10 - 20 min bei Gabe von 500 - 1.500 mU Kollagenase pro Gramm Pankreashomogenisat angegeben. Zum großen Teil fanden sich in bezug auf die Kollagenasemenge nur Gewichtsangaben in der Literatur. Die

Inkubationszeit ist jedoch stark von der Qualität des verwendeten Enzymes abhängig.

Durch Aktivitätsbestimmungen konnten wir hierin weitgehende Unterschiede verschiedener Chargen feststellen. Dadurch zeigt sich, daß die meisten Beschreibungen über die Verwendung von Kollagenase nicht exakt und nur schwierig miteinander zu vergleichen sind, wobei berücksichtigt werden muß, daß früh aus dem Zellverband gelöste Inseln durch längere Einwirkdauer des Enzymes geschädigt werden (20; 30). Umgekehrt bleiben bei unzureichender Digestion zahlreiche Inseln in den parenchymatösen Partikeln verborgen, die nicht zur Transplantation gelangen.

Wir erreichten bei zahlreichen Probeisolierungen die besten Ergebnisse durch Zusatz von 1.000 mU Kollagenase pro Gramm Pankreasbrei und Inkubation für 20 min in 2 ml/g Gewebe 37°C warmer "Hank's"-Lösung.

Bei der weiteren Trennung von exokrinem und endokrinem Gewebe werden unterschiedliche Anstrengungen unternommen. Das am häufigsten praktizierte Verfahren ist die unter Ziffer II, 1. genauer beschriebene "Fikoll-Schichtentrennung", derer sich Lacy, Sutherland, Scharp u.a. bedienten (4; 5; 31; 73; 77). Die erzielten Erträge erscheinen uns mit 5 - 10 % des Inselgewebes unbefriedigend. Außerdem soll die Anwendung der "Fikoll-Schichtentrennung" mit schädigendem Einfluß auf das Transplantat verbunden sein. Ein zusätzlicher Mangel dieser Trennmethode liegt in ihrem hohen Verfahrensaufwand, von dem wir uns auch in eigenen Versuchen überzeugen konnten.

Sehr viele Arbeitsschritte wie mehrmaliges Waschen des Gewebes nach der Zentrifugation im Fikollmedium und jeweils erneutes Zentrifugieren und Dekantieren deuten auf mangelende Durchführbarkeit in der klinischen Anwendung, nicht zuletzt, weil mit jedem Arbeitsschritt die Gefahr der bakteriellen Kontamination steigt.

Schließlich wird als kritischer Wert für die Überlebenszeit der Inseln bei der Isolierung eine Zeit von ca. 90 min angegeben (21; 62).

Dieser wurde bei den eigenen Versuchen mit Fikoll und auch von anderen Autoren überschritten (48).

Aus diesen Gründen wählten wir zur weiteren Reinigung nach der Digestion ein Verfahren reiner Filtrierung mit speziell abgestuften Filtern.

Versuche der Filtrierung in anderer Form wurden schon von Offord (69) und Shibata (77) beschrieben. Der erreichte Reinheitsgrad war jedoch bei diesen Untersuchungen nicht ausreichend, so daß ein weiterer Schritt, bei Shibata eine "Fikoll-Trennung" bei Offord eine "Hand-picking", folgen mußte.

Durch das oben beschriebene Filtersystem erzielten wir Erträge bis zu 20 % aller vorhandenen Inseln und übertrafen damit die der zuvor genannten Autoren.

Auch die Verunreinigung des Transplantationsgutes mit ca. 80 % exokrinem Material war nach bisherigen Erkenntnissen bei der intraportalen Transplantation tolerabel, wie Gerasch (23) zeigte, so daß auf weitere Trennungsschritte verzichtet werden konnte. Überzeugend war auch die einfache Handhabung des Filtersystemes, die eventuell durch einige technische Änderungen sogar noch verbessert werden könnte.

Bei der Einhaltung von sterilen Kautelen ergaben sich keine Probleme. Mit maximal 60 min wurde eine Isolationszeit erreicht, mit welcher der kritische Wert von 90 min deutlich unterschritten wurde.

2. Diabetesmodell

Für verschiedene Fragestellungen auf dem Gebiet der Diabetologie finden heute mehrere experimentelle Diabetesmodelle Verwendung. Um nur einige zu nennen, sind dies: Spontandiabetische Kleinsäugetiere, Tiere nach vollständiger Pankreatektomie oder solche mit medikamentös durch Alloxan oder Streptozotocin induziertem Diabetes.

Ist eine Autotransplantation von Langerhans'schen Inseln mit anschließender Funktionskontrolle vorgesehen, steht praktisch nur die operative Entfernung des Pankreas als Diabetesmodell zur Verfügung.

Diese Methode bietet außerdem die größte Sicherheit, soll eine total diabetische Stoffwechsellage erreicht werden. Nachteilig ist allerdings der hohe operative Aufwand mit entsprechender postoperativer Sterblichkeit und die exokrine Insuffizienz mit ihrem nicht beherrschbaren Einfluß auf das nutritive Verhalten der Versuchstiere.

Wegen der engen anatomischen Beziehung zwischen Pankreas und Duodenum wählten wir zunächst die Duodenopankreatektomie. Diesem schweren Eingriff erlagen in der postoperativen Phase, wie auch von Untersuchern wie Bornemisza und Reding (8, 71) beschrieben, bis 50 % der Versuchstiere.

Die Letalität konnte auf unter 20 % gesenkt werden, indem wir bei der Entfernung der Drüse unter Schonung der A. pankreaticoduodenalis das Duodenum beließen, wie von Markowitz erstmals in den 30er Jahren und später zu Transplantationszwecken von Kretschmer und Sutherland praktiziert (53, 36, 38).

Die negativen Folgen der exokrinen Insuffiziens waren jedoch trotz Enzymsubstitution bei allen Tieren festzustellen. Diese Tatsache erschwerte wegen der auftretenden Kachexie, die zum Teil auch durch die diabetische Stoffwechsellage mitbedingt war, die Durchführung von Langzeitversuchen über 6 Monate nach Transplantation von Inseln. Häufiger waren wir wegen der Schwäche der Tiere zum

vorzeitigen Versuchsabschluß gezwungen.

Da bei der Belassung des Duodenums eventuell Inselgewebe an diesem oder entlang der A. pancreaticoduodenalis zurückgeblieben sein konnte, war vor allem die Frage nach der Gleichberechtigung beider oben genannter Möglichkeiten zur Pankreasexstirpation als vollständiges diabetisches Modell zu beantworten.

Diese Antwort konnte durch die vorliegenden Ergebnisse bestätigt werden. Bei der mittleren Überlebenszeit schnitten die Kontrolltiere mit Pankreatektomie nach Markowitz noch um 2 Tage besser ab als diejenigen mit Duodenopankreatektomie. Dieses war sicherlich eine Folge der schonerenden Operationsmethode.

Alle anderen Parameter ließen keine Unterscheidung der beiden Kontrollgruppen mehr zu. Sowohl das sofortige und gleichartige Eintreten der Hyperglycämie bis zum Tode der Tiere wie auch die absolute Glucoseintoleranz bei Belastung bestätigten den pankreopriven Zustand aller Tiere.

Ebenso wäre zu erwarten gewesen, daß der Seruminsulinspiegel beider Gruppen nach kurzer Zeit - die biologische Halbwertzeit des Seruminsulins beträgt 20 min (27) - unter die Nachweisgrenze gefallen wäre.

Erstaunlicherweise waren sowohl nach Duodenopankreatektomie wie auch nach reiner Pankreatektomie Insulinwerte bis zu 2 µU/ml zu messen. Inwieweit dies auf Meßfehler (die Genauigkeit der Insulinbestimmung im RIA fällt unter 3 µU/ml stark ab) oder etwa auf extrapankreatische, geringe Insulinproduktion zurückzuführen war, konnten wir nicht beantworten. Eine Untersuchung von Rosenzweig et al. (72) sprach für letztere Möglichkeit, da er eine extrapankreatische Insulinbildung bei Ratten und sogar beim Menschen beschrieb.

Dieser Effekt trat auch bei allen Tieren gleichermaßen auf, so daß auch hiermit die Anerkennung beider Diabetesmodelle nicht in Frage gestellt wurde.

3. Reaktion des Gastorganes

Zahlreiche Gewebe wurden im Verlauf der jungen Geschichte der Inseltransplantation als Transplantationsort getestet. Von diesen unter II, 2. erwähnten Möglichkeiten erlangten die Milz und die Leber eine bevorzugte Stellung als Gastorgan für das Transplantat.

Bei der Implantation von gröberen Pankreasfragmenten führen diese bei Einschwemmung via Pfortader in die Leber zu massiven portalen Obstruktionen und damit zu Pfortaderhochdruck, so daß bei Verwendung von groß oder gar nicht gereinigten Gewebeaufbereitungen die Milz als günstiger anzusehen ist, wie Versuche von Kretschmer und Sutherland (40, 81) belegen.

Andererseits birgt die Inokulation in die Milz die Gefahr von starken Blutungen. Weiterhin wird in der Humanmedizin bei der Duodenopankreatektomie die Milz in der Regel aus technischen Gründen mitentfernt, so daß bei der klinischen Autotransplantation von Inseln nach erforderlicher Duodenopankreatektomie nur noch die Leber als Transplantatempfänger zur Verfügung steht (16).

Kolb (36) führte Autotransplantationen in die Leber und Milz pankreatektomierter Hunde durch und konnte hierbei praktisch keine Unterschiede feststellen.

Voraussetzung für eine erfolgreiche Transplantation von Inselgewebe in die Leber ist, wie erwähnt, die genügend feine Aufbereitung des Transplantationsgutes. Unsere Filtermethode gewährleistete eine hierzu ausreichend feine Trennung. Außerdem gelangten nur Partikel bis zu einer Größe von höchstens 300 µ zur Transplantation.

Die Applikation des Transplantates über einen dünnen Venenkatheter, welcher nach Punktion einer Mesenterialvene in die V. portae vorgeschoben wurde, gelang stets mühelos. Intra- und postoperative Komplikationen traten im Zusammenhang mit der Transplantation nicht auf. Der Pfortaderdruck stieg zwar nach der Installation der Inselsuspension kurzfristig leicht an, bewegte sich jedoch bei Ver-

suchsabschluß wieder im Normalbereich. Auch durch Portographie konnten keine gröberen Pfortaderverschlüsse nachgewiesen werden. Infolge der histologisch nachgewiesenen vielfältigen Mikrothrombosierungen kleinster Pfortaderäste und bindegewebigen Organisierung von Transplantaten wäre eine Parenchymschädigung und damit eine Funktionsstörung der Leber sowie eine portale Hypertension zu fürchten gewesen. Bei ausreichender Gewebeaufbereitung scheint das Ausmaß dieser Veränderungen zu gering für eine Organschädigung.

Wie die Bestimmung der Leberenzyme zeigte, traten auch längerfristig keine Leberfunktionsstörungen auf. Der kurzzeitige Anstieg vor allem des SGPT schien dem Verlauf nach nur eine vorübergehende Reaktion darzustellen.

Diese Tatsachen zusammengenommen ergaben in Übereinstimmung mit anderen Untersuchern wie Bretzel, Dobroschke und Kolb (10; 16; 36) bei unseren Versuchen keinen Anhalt für eine Alteration der Leber durch die Inseltransplantation.

4. Funktion der Insel nach Autotransplantation

Die Hälfte der Tiere mit Autotransplantation wies bis spätestens zum 4. postoperativen Tag normale Nüchternblutzuckerspiegel auf. Bei den restlichen Hunden war der Blutzucker im Vergleich zur Norm mäßig bis stark erhöht. Doch zeigte sich gegenüber den Kontrolltieren insgesamt eine signifikante Verbesserung der Stoffwechsellage.

Uns fiel auf, daß bereits ein Abfall des Blutzuckers unter 200 mg % in den ersten beiden Tagen auf einen positiven Versuchsablauf hindeutete, während alle anderen Tiere mit verzögerter Reaktion auch längerfristig deutlich schlechtere Ergebnisse erbrachten. Mosimann dagegen hält zunächst eine längere Hyperglycämie für die Funktionsaufnahme der Inseln für erforderlich (63).

Leider korreliert unser Versuchsergebnis nicht vollständig mit dem hohen Ertrag an isolierten Inseln. Wenn man davon ausgeht, daß andere Untersucher ähnliche Resultate mit Inselausbeuten von weniger als 10 % des Gesamtaufkommens erzielen, könnte man erwarten, daß bei einer Inselausbeute von durchschnittlich 15 % zumindest sämtliche Nüchternblutzuckerwerte der Tiere nach Transplantation im Normbereich lägen. Insofern widersprechen unsere Ergebnisse denen von Federlin, Gray und Sutherland (19; 25; 82), die eine Ausbeute von 6 - 10 % für eine erfolgreiche Transplantation für ausreichend halten. Eine wesentliche Aussage wäre vielleicht durch eine in-vitro-Prüfung der isolierten Inseln im Vergleich zu machen, da durch verschiedene Verfahren die Inseln unterschiedlich geschädigt werden könnten.

Nach mehrwöchiger Versuchsdauer mußten wir Anstiege der zunächst günstigen Blutzuckerspiegel im Sinne eines Funktionsverlustes des Transplantates beobachten. Ein Hinweis von anderen Untersuchern für dieses Verhalten wird nicht gegeben, doch konnten wir die eigene histologische Verlaufskontrolle hiermit gut in Einklang bringen. Die histologische Aufarbeitung der Lebern nach verschieden langer Versuchsdauer weist eine langsame Organisation von nach der Transplantation entstandenen Mikrothromben aus, die auch auf die nachgelagerten Transplantate übergreift. Es zeigen sich weiterhin Resorptionsvorgänge mit starken Rundzellinfiltraten und bindegewebigem Umbau.

Schließlich resultiert der Verlust von nachweisbaren Transplantaten.

Auch diese Reaktionen werden von anderen Autoren nicht beschrieben, jedoch gibt Bretzel an, daß bei Ratten ein Jahr nach Transplantation von Inseln in die Leber keine Transplantate mehr gefunden wurden, ohne jedoch einen Grund hierfür nennen zu können (10).

Da die thromboplastische Aktivität des Pankreasgewebes sehr hoch ist, zusätzlich durch Kontakt des Blutes mit Kollagenfibrillen und alterierten Basalmembranen eine zumindest lokale Aktivierung des Gerinnungssystemes bewirkt wird, ist die relativ starke Mikrothrombosierung im Bereich der Transplantatpartikel erklärlich. Die nachfolgende Organisation scheint zwangsläufig zu folgen.

Dieses ergibt einen Hinweis darauf, daß die Verhinderung von thrombatischen Anlagerungen, eventuell durch Einsatz von Heparin und Proteinasenhemmern wie Aprotonin, für die Erhaltung der transplantierten Inseln wichtig sein könnte.

Die Bestimmung der Seruminsulinspiegel zeigt eine deutliche Verbesserung der Tiere mit Autotransplantation gegenüber den Kontrolltieren. Die normalen Insulinspiegel werden jedoch nicht erreicht. Dennoch ist der Unterschied geringer als bei einem Vergleich mit dem Inselertrag (ca. 15 % des Gesamtorganes) zu erwarten wäre, was auf eine höhere Sekretionsleistung der noch verbliebenen Inseln hindeutet.

Daß diese Leistung sich hiermit bald erschöpft, zeigen die deutlich pathologischen Glucosetoleranzteste.

Hier wird ein stark verzögerter Abfall des Blutzuckerspiegels im Sinne einer Sekretionsstarre nachweisbar. Immerhin schnitten auch hier die transplantierten Tiere signifikant besser als die Kontrolltiere ab. Der Nachweis von Insulin nach intraportaler Transplantation

von Inseln bei Affen gelang Jonasson (32). Er fand, unseren Ergebnissen entsprechend, keinen Anstieg des Seruminsulines nach Glucosebelastung. Auch Henriksson, Kolb und Mirkovitch (31, 36, 59) beschreiben nach intrahepatischer bzw. intralienaler Inseltransplantation verzögerte Glucosetoleranzteste. Allein Kretschmer berichtet von einer weitgehenden Normalisierung der Glucosetoleranz bei Autotransplantation in Leber und Milz pankreatektomierter Hunde(4O).

Die mangelnde Antwort des Transplantates auf eine Glucosebelastung ist wohl im Sinne einer fehlenden Sekretionsreserve zu verstehen. 15 % des gesamten Inselapparates scheinen gerade noch in der Lage zu sein, bei maximaler Hormonproduktion der einzelnen Zelle genügend Insulin bereitzustellen, um normale Nüchternblutzuckerwerte zu erreichen. Bei stärkerer Belastung ist die Insulinausschüttung nicht mehr steigerbar, so daß pathologische Glucosetoleranzteste resultieren.

VI. Zusammenfassung

Zur Isolierung von Langerhans'schen Inseln wurde ein neuartiges Filterverfahren erprobt.

Nach Digestion des Pankreas mittels Kollagenase durchläuft das Gewebe Filter mit verschiedenen Porengrößen, wodurch eine Anreicherung der Inseln aufgrund der Größendifferenz zum exokrinen Gewebe erfolgt. Hiermit wurden Erträge von 15 - 20 % aller Inseln erzielt. Das Transplantationsgut wies eine Verunreinigung mit exokrinem Material von ca. 85 % auf. Diese Verunreinigung ist bei intraportaler Transplantation tolerabel, wenn die einzelnen Partikel eine bestimmte Größe nicht überschreiten.

Bei 15 Hunden wurde nach Pankreatektomie eine Autotransplantation via Pfortader in die Leber vorgenommen.

Diese Tiere wurden einer Gruppe mit 8 duodenopankreatektomierten und 7 pankreatektomierten Kontrolltieren gegenübergestellt. Hieraus ergaben sich folgende Ergebnisse:

Die Pankreatektomie ist ebenso wie die Duodenopankreatektomie ein zuverlässiges diabetisches Modell.

Insgesamt zeigten die Tiere mit Autotransplantation ein signifikant besseres Blutzuckerverhalten als die Kontrolltiere. Die Hälfte der Versuchstiere wies normale Nüchternblutzuckerwerte auf, 3 Tiere zeigten kaum einen Effekt, die restlichen Hunde waren mäßig hyperglycämisch. Die Insulinspiegel dieser Gruppe lagen signifikant höher als bei den apankreatischen Kontrolltieren. Die Glucosetoleranzteste zeigten pathologische Reaktionen, die jedoch von den Kontrolltieren noch deutlich übertroffen wurden.

Nach einigen Wochen stieg bei vielen Tieren der Blutzucker wieder an. Dieses deckt sich mit der histologischen Verlaufskontrolle, die eine Anlagerung von Thromben an die transplantierten Inseln in den Portalästen mit zunehmender Organisation von Thromben und Inseln zeigte.

Die Leber als Gastorgan zeigte keine pathologischen Reaktionen auf die Transplantation. Der Pfortaderdruck normalisierte sich bald nach der Transplantation. Ebenso verhielten sich die Leberenzyme nach anfänglicher, kurzfristiger Erhöhung. Auch die Histologie zeigte keine wesentlichen pathologischen Veränderungen des Leberparenchyms.

VII. Literaturverzeichnis

1. Amamoo D.G., J.E. Woods, K.E. Holley : Effects of intrahepaticly implanted islets of Langerhans on hepatic function in rat
Mayo Clinic Proc 50 : 416 (1975)

2. Andersson A. J. Berg, C.G. Groth, R. Gunnarsson, C. Hellerstrom, G. Lundgren, J. Westman, J. Ostman : Survival of isolated human islets of langerhans maintained in tissue culture
J Clin Invest 57 : 1295 (1976)

3. Andersson A. : Tissue culture of isolated pancreatic islets
Acta Endocrinol 83, Suppl 205 : 283 (1976)

4. Ashcroft S.J.H., P.J. Randle, J.T. Basset : Isolation of human pancreatic islets capable of releasing insulin metabolizing glucose in vitro
Lancet 1 : 888 (1978)

5. Ballinger W.F., P.E. Lacy : Transplantation of intact pancreatic islets in the rat
Surg 72 : 175 (1972)

6. Ballinger W.F., P.E. Lacy, D.W. Sharp et al. : Isografts and allografts of pancreatic islets in rats
Br J Surg 60 : 313 (1973)

7. Barker C.F., A. Naji, W.K. Silvers : Immunologic problems in islets transplantation
Diabetes 29, Suppl 1 : 86 (1980)

8. Bornemisza G., I. Furka, B. Szentkeresky, I. Mirko, P. Demeny : Experimentelle Pankreastransplantation am Schwein
Z Exper Chirurg 11 : 139 (1978)

9. Bowen K.M., L. Andrus, K. Lafferty : Succesful allotransplantation of mouse pancreatic islets to nonimmunosuppressed recipients
Diabetes 29, Suppl 1 : 98 (1980)

10. Bretzel R.G., E. Manns, C. Schomber, K. Federlin : Die Leber als Implantationsort für Langerhans'sche Inseln beim experimentellen Diabetes mellitus.
Morphologische und Stoffwechseluntersuchungen
Verh Dtsch Ges Inn Med 84 : 1213 (1978)

11. Brooks J.R. : Endocrine tissue transplantation
Charles C. Thomas, Springfield 1962

12. Brown J. W.R. Clark, I.G. Molnar, Y.S. Mullen : Fetal pancreas transplantation for the reversal of streotozotocin - induced diabetes in rats
Diabetes 22 : 56 (1976)

13. Brown J., W.R. Clark, R.K. Markhoff, H. Weismann, J.A. Kemp, y.S. Mullen : Pancreastransplantation for diabetes mellitus
Ann Int Med : 951 (1978)

14. Brown J.A. Kemp, S. Hart, W.R. Clark : Cryopreservation of human fetal pancreas
Diabetes 29, Suppl 1 : 70 (1980)

15. Browning H. : Homologous and heterologous transplantation of pancreatic tissue in normal and diabetic mice
Yale J. Biol Med 24 : 141 (1951)

16. Dobroschke J., K Schwemmle, G. Langhoff, H. Laube, R.G. Bretzel, K. Federlin : Autotransplantation von Langerhans'schen Inseln nach totaler Duodenopankreatektomie bei einem Patienten mit chronischer Pankreatitis
D M W 48 : 1905 (1978)

17. Ferner H. : Das Inselsystem des Pankreas
Verlag Georg Thieme, Stuttgart (1951)

18. Federlin K. : Islets transplantation in experimental of the rat
Horm Metab Res 8 : 404 (1976)

19. Ferderlin K., R. Bretzel, K. Helmke : Inseltransplantation - eine Chance für die Behandlung des Diabetes mellitus ?
Med Welt 29 : 538 (1978)

20. Fergusson J., R.H. Allsopp, R.M.R. Taylor, I.D.A. Johnston Isolation of viabe humen pancreatic islets
World J. Surg 1 : 69 (1977)

21. Finch D.R.A., P.H. Wise, P.J. Morris : Succesful intrasplenic transplantation of syngeneic and allogeneic isolated pancreatic islets
Diabetologia 13 : 195 (1977)

22. Frangipane L.G., C.F. Barker, W.K. Silvers : Importance of weak histocompatibility factors in survival of pancreatic transplants
Surg Forum 28 : 294 (1977)

23. Gerasch U., K.D. Rumpf : Der Einfluß exokrinen Drüsengewebes auf den Transplantationserfolg isolierter Langerhans'scher Inseln
Chir For Exp Klin Forsch : 353 (1979)

24. Gray B.N., E. Watkins : Prevention of vascular complications of diabetes by pancratic islets transplantation
Arch Surg 111 : 254 (1976)

25. Gray B.N. : Transplantation of the pancreas: Its present status and future application
Aust N Z J Surg 47 : 143 (1977)

26. Groth C.G., G. Lundgren, R. Gunnarsson, P. Anner, B. Berg, J. Ostman : Segmental pancreatic transplantation with ductligation or drainage to a jejunal roux - en - y loop in nonuremic diabetic patients
Diabetes 29, Suppl 1 : 3 (1980)

27. Harper, Löffler, Petrides, Weiss : Physiologische Chemie
Springer Verlag (1975)

28. Hegre O.D., R.J. Leonard, J.D. Rusin, A. Lazarow :
Transplantation of fetal rat pancreas: Quantitative morphological analysis of islet tissue growth
Anat Res 185 : 209 (1976)

29. Hegre O.D., R.J. Leonard, R.V. Schmitt, A.Lazarow :
Isotransplantation of organcultured neonatal pancreas: reversal of alloxan diabetes in the rat
Diabetes 25 : 180 (1976)

30. Henriksson C., J. Bergmark, G. Claes : Use of trypsin for isolation of islets of Langerhans in the rat
Eur Res 9 : 427 (1977)

31. Henriksson C., J. Bergmark, G. Glaes : Metabolic response to isologous transplantation of small numbers of isolated islets of Langerhans in the rat
Eur Res 9 : 411 (1977)

32. Jonasson O., W.A. Reynolds, G. Snyder, G. Hoversten :
Experimental and clinical therapy of diabetes by transplantation
Transplant Proc 9 : 223 (1977)

33. Junod A., A.E. Lambert, L. Orgi : Studies of diabetogenic action of streptozotocin
Proc Soc Exp Biol Med 126 : 201 (1967)

34. Kemp C.B., M.J. Knight, D.W. Scharp et al. : Effect of Transplantation site on results of pancreatic islet isografts in diabetic rats
Diabetologia 9 : 489 (1973)

35. Kemp J.A., P. Mazur, Y. Mullen, R.H. Miller, W. Clark, J. Brown :
Reversal of experimental diabetes by fetal rat pancreas.
I. Survival and function of fetal rat pancreas frozen to - 196° C
Transplant Proc 9 : 325 (1977)

36. Kolb E., R. Ruckert, F. Largiadèr : Intraportal and intrasplenic autotransplantation of pancreatic islets in the dog
Eur Surg Res 9 : 419 (1977)

37. Kramp R.C., C.C. Gongdon, L.H. Smith : Recovery from experimental diabetes in mice after pancreastransplantation
Diabetes 23 : 183 (1974)

38. Kretschmer G.J., D.E.R. Sutherland, A.J. Matas, J.S. Najarian :
Autotransplantation von Pankreasfragmenten an total pankreatektomierten Hunden unter Verzicht auf Trennung von exo- und endokrinem Gewebe
Langenbecks Arch Chir, Suppl 78 : 203 (1978)

39. *Kretschmer G.J., D.E.R. Sutherland A.J. Matas, T.L. Cain, J.S. Najarian : Autotransplantation of pancreatic islets without separation of exocrine and endocrine tissue in totally pancreatectomised dogs*
Surg 82 : 74 (1977)

40. *Kretschmer G.J., D.E.R. Sutherland A.J. Matas, W.D. Payne, J.S. Najarian : Autotransplantation of pancreatic fragments to the portel veine and spleen of totally pancreatectomised dogs*
Anals of Surgery 187 : 79 (1978)

41. *Kretschmer G.J. : Autotransplantation von Pankreasfragmenten: Untersuchungen am Diabetesmodell total pankreatektomierter Hunde*
Wien Klin Wschr, Suppl 90 : 3 (1978)

42. *Lacy P.E., M. Kostianowsky : Method for the isolation of intact islets of Langerhans from rat pancreas*
Diabetes 16 : 35 (1967)

43. *Lacy P.E., J.M. Davie, A.H. Finke : Effect of culture on islet rejection*
Diabetes 29, Suppl 1 : 93 (1980)

44. *Largiadèr F. : Farewell to the pancreatic organ transplantation ?*
Eur Surg Res 9 : 399 (1977)

45. *Largiadèr F. : Erfolgreiche Pankreasinsel-Allotransplantation*
Schweiz Med Wschr 109 : 1733 (1979)

46. *Lillehei R.C., J.O. Ruix, C. Aquino, F. Goetz : Transplantation of the pancreas*
Acta Endocrinol 83, Suppl 205 : 303 (1976)

47. *Lindall A., M.W. Steffes, R. Sorenson : Immunoasayable insulin content of subcellular fractions of rat islet*
Acta Endocrinol 85, Suppl 218 : 303 (1976)

48. *Lorenz D., H. Lippert, W. Tietz, V. Worm, H.-J. Hahn, A. Dorn, G. Koch, M. Ziegler, K.D. Rosenbaum : Transplantation of isolated islets of Langerhans in diabetic dogs*
J Surg Res 27 : 181 (1979)

49. *Lundgren G., A. Anderson, H. Borg, K. Buschard, C.G.Groth, R. Gunnarsson et al. : Structural and functional integrity of isolated humen islets of Langerhans maintained in tissue culture for 1 - 3 weeks*
Transplant Proc 9 : 237 (1977)

50. Mandel T.E., L Higginbotham : Organ culture and transplantation of fetal mouse pancreatic islets
Transplant Proc 11 : 1505 (1979)

51. Mansford K.R.L., L. Opie : Comparisons of metabolic abnormalities in diabetes mellitus induced by streptozotocin or by alloxan
Lancet 1 : 670 (1968)

52. Markowitz J., J. Archibald, H.G. Downie : Experimental surgery
The Wilkins and Wilkins companie, fifth edition (1964)

53. Matas A.J., D.E.R. Sutherland, M.W. Steffes, J.S. Najarian : Short term culture of adult pancreatic fragments for purification and transplantation of islets of Langerhans
Surg 80 : 183 (1976)

54. Matas A.J., D.E.R. Sutherland, M.W.Steffes, J.S. Najarian : Islets transplantation using neonatal rat pancreata : quantitative studies
J Surg Res 20 : 143 (1976)

55. Matas A.J., D.E.R. Sutherland, W.D. Payne, J. Grotting, M.W. Steffes, G.J. Kretschmer, J.S. Najarian : Successful transplantation of neonatal rat islet tissue preserved for up to 63 hours
Trans Am Suc Artif Intern Organ 23 : 347 (1977)

56. Mauer S.M., D.E.R. Sutherland, M.W. Steffes, R.J. Leonard, J.S. Najarian, A.F. Michel, D.M. Brown : Pancreatic islets transplantation. Effects on the glomerular lesions of experimental diabetes in the rat
Diabetes 23 . 748 (1974)

57. Mauer S.M., M.W. Steffes, D.E.R. Sutherland et al. : Studies on the rate of regression of the glomerular lesions in diabetic rats treated with pancreatic islet transplantation
Diabetes 24 : 280 (1975)

58. Mirkovitch V., M. Campiche : Successful intransplenic autotransplantation of pancreatic tissue in totally pancreatectomized dogs
Transplant 21 : 265 (1976)

59. Mirkovitch V., M. Cmapiche : Absence of diabetes in dogs after total pancreatectomie and intrasplenic autotransplantation of pancreatic tissue
Transplant Proc 9 : 321 (1977)

60. Molnar G.D., W.F. Taylor, M.M. ho : Day to day variation of continiously monitores glycaemia; a further measure of diabetes instability
Diabetologia 8 : 342 (1972)

61. Morris P.J., D.R. Finch, J.F. Garvey, M.D. Poole, P.R. Millard : Suppression of rejection of allogenic islet tissue in the rat
Diabetes 29, Suppl 1 . 107 (1980)

62. Moser R., H.V. Meili, F. Largiadèr : Die Ischämietoleranz des Pankreas
Z Ges Exp Med 143 : 266 (1967)

63. Mosiman F. : La transplantation des îlots de Langerhans, bilance et perspectives
Schweiz Med Wschr 110 : 550 (1980)

64. Moskalewski S. : Isolation and culture of islets of Langerhans of the guinea pig
Gen Compar Endocrin 5 : 342 (1965)

65. Mullen Y., W.R. Clark, J. Kemp, I.G. Molnar, J. Brown : Reversal of experimental diabetes by fetal rat pancreas II. Critical procedures for transplantation
Transplant Proc 9 : 329 (1977)

66. Mullen Y. : Specific immunosuppression for fetal pancreas allografts in the rat
Diabetes 29, Suppl 1 : 113 (1980)

67. Najarian J.S., D.E.R. Sutherland, A.J. Matas, M.W. Steffes, R.L. Simmons, F.C. Goetz : Human islet transplantation: A preliminary report
Transplant Proc 9 : 223 (1977)

68. Nakagawara G., G. Yamasaki, S. Kimura, Y. Kojima, I. Miyazaki : Insulin - releasing activity and successful transplantation of pancreatic islets preserved by tissue culture
Surg 83 : 188 (1978)

69. Olford R.E., P.A. Halban : Isolation of pancreatic islets of Langerhans by filtration on nylon mesh
Biochem Biophys Res Commun 82 : 1091 (1978)

70. Panijananond P., A.P. Monaco : Enhacement of the pancrestic islet allograft survival with ALS and donor bone marrow
Surg Forum 25 : 379 (1974)

71. Reding R., R. Menzel, W. Nowak, H. Hommel, Ch. Rieger, S. Knospe : Experimentelle Studien zur Duodenopankreatektomie beim Hund
Zbl Chir 93, Suppl 1 : 189 (1969)

72. Rosenzweig J.L., J Havrankova, M.A. Lesniak, M. Brownstein, J. Roth: Insulin is ubiquitous in extrapancreatic tissues of rats and humans
Proc Natl Acad Sci USA 77 : 572 (1980)

73. Scharp D.W., C.B. Kemp : The use of ficoll in the preparation of viable islets of Langerhans from the rat pancreas
Transplant 16 : 686 (1973)

74. Scharp D.W., J.J. Murphy, W.T. Newton, W.F. Ballinger, P.E. Lacy : Transplantation of islets of Langerhans in diabetic rhesus monkeys Surgery 77 : 100 (1975)

75. Scharp D.W., R.C. Merrel, M.M. Feldmeier, R. Downing, W.F. Ballinger : Pseudo - islet formation and culture from canine isolated pancreatic cells In vitro 15 : 216 (1979)

76. Scharp D.W., R. Downing, R.C. Merrell, M. Greider : Isolating the elusive islet Diabetes 29 Suppl 1 : 19 (1980)

77. Shibata A., C.W. Ludvigsen, S.P. Naber, M.L. McDaniel, P.E. Lacy : Standardization of a digestion-filtration method for isolation pancratic islets Diabetes 25 : 667 (1976)

78. Shulack J.A., C.R. Reckard : Experimental transplantation of pancreatic allografts J Surg Res 25 : 562 (1978)

79. Slavin S., S. Strober, Z. Fuks, H.S. Kaplan : Immunosuppression and organtransplantation tolerance using total lyphoid irradiation Diabetes 29, Suppl 1 : 121 (1980)

80. Sutherland D.E.R., M.W. Steffes, G.E. Bauer, D. McManus, B.D. Noe, J.S. Najarian : Isolation of human and porcine islets of Langerhans and islet transplantation in pigs J Surg Res 16 : 102 (1974)

81. Sutherland D.E.R., G.J. Kretschmer, M.W. Steffes, J.S. Najarian : Experience with auto and allotransplantation of pancreatic fragments to the spleen of totally pancreatectomized dogs Trans Am Soc Artif Intern Organs 23 : 723 (1977)

82. Sutherland D.E.R., A.J. Matas, J.S. Najarian : Pancreas and islet transplantation World J Surg 1 : 185 (1977)

83. Sutherland D.E.R., A.J. Matas, J.S. Najarian : Pancreatic islet cell transplantation Surg Clin North Am 58 : 365 (1978)

84. Sutherland D.E.R., A.J. Matas, F.C. Goetz, J.S. Najarian : Transplantation of dispersed pancreatic islets in humans Diabetes 29, Suppl 1 : 31 (1980)

85. Talmage D.W. : Effects of oxygen, temperature and time of culture on the survival of mouse thyriod and pancreas allografts Diabetes 29, Suppl 1 : 105 (1980)

86. Tze W.J., F.C. Wong, L.M. Chen : Implantable artifical capillary unit for pancreatic islets allografts and xenografts Diabetologia 16 : 147 (1979)

87. Winer : Statistical principals in experimental design McGrawhill, Kap. 7 (1971)

88. *Younozai R. : Homotransplantation of isolated pancreatic islets Diabetes 19 : 406 (1970)*

89. *Ziegler M.M., C.R. Reckard, A. Naji, C.F. Barker : Extended function of isolated pancreatic islets isografts and allografts Transplant Proc 7 : 743 (1975)*

L E B E N S L A U F:

Geboren: 20.08.1954 in Bochum;

Eltern: Wilhelm und Waltrudis Brand geb. Voß;

Schule: Evgl. Volksschule in Bochum von 1961 - 1965;

Staatl. humanistisches Gymnasium in Bochum von 1965 bis zum Abitur 1973

Bundeswehr: Juli 1973 - September 1974 Grundwehrdienst

Studium: WS 1974/75 - SS 1976 Studium der Wirtschaftswissenschaften an der Universität Bochum; während dieser Zeit Erwerb von 4 vorklinisch medizinischen Leistungsscheinen als Zweithörer an der TH Aachen;

Oktober 1976 Aufnahme des "ordentlichen Studiums" der Medizin im 3. Fachsemester an der Universität Düsseldorf;

März 1979 Physikum; Mai 1979 Beginn der praktischen Arbeit an vorliegender Dissertation;

März 1980 1. ärztliche Prüfung;

März 1982 2. ärztliche Prüfung;

Zur Zeit letztes Drittel des praktischen Jahres im Marienhospital Düsseldorf.

Düsseldorf im Dezember 1982

.....